

ISSN 1810-634X

# REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 85 N° 4  
OCTUBRE - DICIEMBRE 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

**Pontificia Universidad Católica del 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](mailto:sqperu@gmail.com)

Portal web: [www.sqperu.org.pe](http://www.sqperu.org.pe)

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

Certificado N° 95-1567

---

**Vol 85**

**OCTUBRE - DICIEMBRE 2019**

**N° 4**

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)**

<b>Presidente</b>	: MSc. Graciela Untiveros Bermúdez
<b>Vice-Presidente</b>	: Mg. Helmer Helí Lezama Vigo
<b>Tesorero</b>	: Dr. Juan Manuel Parreño Tipián
<b>Secretaria</b>	: Quím. Claudia Cecilia Villanueva Huerta
<b>Director Administrativo</b>	: Mg. Neptalí Ale Borja
<b>Director Biblioteca</b>	: Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
<b>Vocales</b>	: 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° 4 – 2019)**

<b>Editorial</b> .....	387
<b>Trabajos Originales</b>	
- Catalizadores basados en Ru-Fe soportados sobre TiO <sub>2</sub> para la hidrogenación de palmitato de metilo con obtención de alcohol cetílico, por Pieer Rodríguez, Enrique Neira, Rosario Sun Kou, Gino Picasso.	389
- Efecto de la temperatura de sustrato sobre la estructura y resistividad eléctrica de películas delgadas de nitruro de molibdeno, por José Noé Valdivia Rodas, Arturo Fernando Talledo Coronado, Segundo Jáuregui Rosas, Pedro De La Cruz Rodríguez, Manuel Enrique Guevara Vera.	406
- Estudio preliminar de la composición nutricional del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado en pulpa de café, por Jessica I. Nieto-Juárez, Ángel D. Cuzcano-Ruiz, Walter A. Reyes-López.	422
- Estudio teórico del plasmón en nanoesferas de oro, por Ana María Osorio Anaya, Joaquín J. Manrique Fajardo, Oscar Cornejo Sánchez.	432
- Influencia del pH en la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) a partir de un hidrogel a base de $\beta$ -Quitósano, por Sthefanie Cabrel Rengifo, Graciela Untiveros Bermúdez, José Luis Aguilar Olano.	440
- Modelos de migración del plomo de dos envases celulósicos en contacto con simulante de alimentos, por Gerson Martín Cabrejos Hurtado, Walter Francisco Salas Valerio.	452
- Preparación y caracterización de biosorbentes basados en compósitos de MWCNT-Magnetita-Hidroxiapatita y su potencial aplicación en la remoción de metales pesados, por Golfer Muedas Taipe, Andrea Leticia Almandoz Landa, Fátima Amanda Santillán Espinoza.	463
- Pretratamiento e hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz, por Yasmin Castillo García, Juan Juscamaita Morales, Paola A. Jorge Montalvo, Lizardo Visitación Figueroa.	476
- Producción y caracterización química de biochar a partir de residuos orgánicos avícolas, por Enmer Trujillo A., Christian Eduardo Valencia A., María Cecilia Alegría A., Alejandrina Honorata Sotelo M., Mary Flor Césare C.	489
- Purificación y algunas propiedades bioquímicas y moleculares de una nueva fosfolipasa A2 no miotóxica del veneno de la serpiente <i>Bothrops atrox</i> , por Edwin Quispe, Daniel Torrejon, Lorgio Bautista, Gustavo Sandoval, Edith Rodríguez, Fanny Lazo, Dan vivas-Ruiz y Armando Yarlequé.	505
- Selenio total y viabilidad celular en la obtención de selenio-levadura, por Carmen Alicia Rodríguez Best, Mario Ceroni Galloso, Elvito Fabián Villegas Silva, Teresa Dámaris Rebaza Cárdenas.	518

- Informaciones	527
- Índice de materias	529
- Índice de autores	533

---

**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](mailto: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](mailto: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

### **LAS SERPIENTES VENENOSAS: UN MODELO DE EVOLUCIÓN Y DE PRODUCCIÓN DE COMPONENTES TÓXICOS**

Dentro de la biodiversidad que existe en nuestro planeta, las serpientes están involucradas en la cultura de los pueblos, los procesos evolutivos, la especialización en los tipos de veneno y el uso que se les puede dar a alguno de los componentes tóxicos en el campo de la farmacología y la medicina.

Numerosas culturas tienen entre sus deidades más comunes a las serpientes, como la cultura hindú y la incaica. Sin embargo, la biblia señala a la serpiente como un representante del mal, que originó la expulsión de Adán y Eva del paraíso. Asimismo, las culturas del medio oriente y Egipto consideran a las serpientes como animales relacionados con la fertilidad, ya que en los desiertos aparecen después de las copiosas lluvias.

El Perú es uno de los países privilegiados en la tenencia de serpientes, gracias a su clima y sus condiciones ambientales, de manera que tenemos a tales reptiles en la selva amazónica, pero también en los valles interandinos de la sierra, así como en las lomas y desiertos en la costa. Se considera que existen 33 especies de serpientes venenosas y no menos de 60 carentes de veneno entre culebras y boas. Dichos animales participan en la cadena trófica, alimentándose principalmente de roedores, pero de acuerdo con su tamaño pueden comer mamíferos mayores ya que todas son carnívoras.

Dado que los reptiles carecen de extremidades, mala visión y en el caso de las venenosas una dentadura frágil, ellas deben inyectar veneno a sus presas para inmovilizarlas, matarlas e iniciar su digestión. En el caso de las no venenosas se alimentan de insectos o pequeños mamíferos (culebras) o de animales grandes a los cuales estrangulan usando su poderosa musculatura (boas). Si hablamos de las venenosas, en su mayoría, ellas tienen dos colmillos acanalados conectados a una glándula productora de veneno. Si extraemos este producto biológico podemos introducirnos en el campo de sus componentes tóxicos.

Un primer ensayo que se efectúa es el análisis del contenido proteico, el cual fluctúa entre el 65 al 95 % del contenido total del veneno; ello depende de la especie, estado fisiológico y las condiciones ambientales. Mediante análisis electroforético en geles de poliacrilamida podemos determinar el número de bandas proteicas, que en general es típico para cada serpiente. Las que pertenecen a la familia Viperidae tienen un mayor número de proteínas (15 a 25), mientras que las de la familia Elapidae muestran un número menor (8 a 12).

Pero ¿Cuáles son los principales componentes bioactivos del veneno? Existen dos grandes grupos: las enzimas (familia Viperidae) y las toxinas (familia Elapidae). Algunos venenos tienen una mixtura de ambos grupos, por lo que se considera que cada veneno debe estudiarse por separado, sin asumir que uno es igual al otro. Entre las enzimas más conocidas están las L-aminoácido oxidasas (LAO) que le dan al veneno acción antimicrobiana y otras propiedades,

las proteínas coagulantes como la enzima similar a trombina (EST), las anticoagulantes como las fibrinogenasas y las fosfolipasas A2 (PLA2) que tienen una variedad de acciones biológicas: anticoagulante, miotóxica, edemática, neurotóxica y hemolítica. Adicionalmente, es característica la presencia de hialuronidasa (HA) que actúa como un factor difusor del veneno, permitiendo su traslado a los tejidos de la presa o de la víctima. Se ha observado que las HA son más abundantes en las serpientes de mayor tamaño, puesto que sus presas también son grandes. También podemos encontrar una gama de proteasas, algunas con acción hemorrágica, las que degradan proteínas del plasma como albúmina sérica y otras que atacan proteínas asociadas a las membranas y compartimentos celulares.

En consecuencia, las características de un envenenamiento están en relación con los componentes cualitativos y cuantitativos del veneno y la observación del cuadro clínico que permitirá acercarnos en primera instancia al tipo de serpiente que causó el accidente para usar el antiveneno o suero antiofídico que corresponda.

El Instituto Nacional de Salud (INS) produce suero antibotrópico polivalente, suero antilachésico y suero anticrotálico para neutralizar los envenenamientos por especies del género *Bothrops* (jergones), de *Lachesis muta* (shushupe) y del género *Crotalus* (serpiente cascabel). Dichos sueros se suministran gratuitamente a los accidentados a través de hospitales y postas médicas en el país.

Adicionalmente, debemos indicar que el veneno es una fuente de potenciales medicamentos, así se tiene que la EST ha sido producida comercialmente bajo la denominación de Reptilasa (*Bothrops atrox*) o Ancrod (*Calloselasma rhodostoma*) y que se han empleado con éxito en el proceso de sangrado causado por traumas. Asimismo, existen estudios acerca de la capacidad antiparasitaria de las PLA2 y de la fibrinogenasa con su acción antitrombótica. Uno de los hallazgos más interesantes fue la de un péptido hipotensor que inhibe la conversión de angiotensina I en angiotensina II y por tanto genera descenso de la presión arterial, este componente, llevado al terreno farmacológico, constituye uno de los medicamentos más usados en el mundo para controlar la hipertensión.

Finalmente, debemos indicar que estudios en nuestro laboratorio de la UNMSM y otros similares en diversos lugares del mundo, señalan la variabilidad en acción biológica de LAO: agente antimicrobiano, antiparasitario, inhibidor de la agregación plaquetaria y acciones, hemorrágica, edemática y apoptótica. Los últimos estudios relacionados con la capacidad de inhibir la metástasis en el cáncer son promisorios.

***Dr. Armando Yarlequé Chocas***

## CATALIZADORES BASADOS EN Ru-Fe SOPORTADOS SOBRE TiO<sub>2</sub> PARA LA HIDROGENACIÓN DE PALMITATO DE METILO CON OBTENCIÓN DE ALCOHOL CETÍLICO

Pieer Rodríguez<sup>a</sup>, Enrique Neira<sup>a</sup>, Rosario Sun Kou<sup>b</sup>, Gino Picasso<sup>a\*</sup>

### RESUMEN

Se estudió el sistema catalítico Ru-Fe soportado sobre titania para la hidrogenación selectiva del palmitato de metilo al producto alcohol cetílico. Los catalizadores basados en Ru-Fe soportados en TiO<sub>2</sub> fueron preparados por el método de coimpregnación húmeda: Ru, como metal activo y Fe, como promotor catalítico, soportado en TiO<sub>2</sub>, sintetizado por el método sol-gel, que permitió mejores propiedades texturales con respecto al soporte comercial. El análisis de sorción de N<sub>2(g)</sub> mostró isotermas de tipo IV con poros cilíndricos y los difractogramas XRD revelaron perfiles similares al soporte, sugiriendo una alta dispersión metálica. Los perfiles de reducción del catalizador Ru-Fe/TiO<sub>2</sub> mostraron un desplazamiento de los picos de consumo de hidrógeno hacia mayores temperaturas con el aumento de la carga metálica, evidenciando una posible interacción metal-soporte. El análisis TPD-H<sub>2</sub> mostró que los catalizadores Ru-Fe soportados en titania presentaron más tipos de adsorción de hidrógeno que su contraparte monometálica. La reacción se realizó en un reactor batch de flujo no continuo de H<sub>2(g)</sub> a 280 °C y 5,5 MPa de presión. Los productos de la reacción usando el catalizador 10 % Ru(4)/Fe(1) mostraron una alta conversión de 90 % y 12 % de selectividad hacia alcohol cetílico, posiblemente debido a la capacidad del catalizador de almacenar mayor cantidad de H<sub>2</sub> selectivo promocionado por interacciones metal-soporte.

**Palabras clave:** aceite de palma, hidrogenación, alcohol cetílico, palmitato de metilo, titania, rutenio, hierro.

---

<sup>a</sup> Laboratorio de Investigación de Físicoquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Rímac, Lima, Perú, \*gpicasso@uni.edu.pe

<sup>b</sup> Departamento de Ciencias - Sección Química, Pontificia Universidad Católica del Perú, Av. Universitaria 1801- Lima 32

## CATALYSTS BASED ON Ru-Fe SUPPORTED ON TITANIA FOR HYDROGENATION OF METHYL PALMITATE TOWARDS CETYL ALCOHOL

### ABSTRACT

Ru-Fe catalytic system supported on titania for the selective hydrogenation of methyl palmitate towards the cetyl alcohol product was studied. The Ru-Fe-based catalysts supported on TiO<sub>2</sub> were prepared by the wet coimpregnation method: Ru, as active metal and Fe, as a catalytic promoter, supported on TiO<sub>2</sub>, synthesized by the sol-gel method, which allowed better textural properties with respect to commercial support. Sorption analysis of N<sub>2(g)</sub> showed type IV isotherms with cylindrical pores and XRD diffractograms revealed profiles similar to the support, suggesting high metal dispersion. The reduction profiles of the Ru-Fe/TiO<sub>2</sub> catalysts showed a shift of the hydrogen consumption peaks towards higher temperatures with the increase of the metal loading, indicating a possible metal-support interaction. TPD-H<sub>2</sub> analysis showed that the Ru-Fe catalysts supported on titania presented more types of hydrogen adsorption than their monometallic counterpart. The reaction was carried out in a batch reactor of non-continuous flow of H<sub>2(g)</sub> at 280 °C and 5.5 MPa of pressure. The reaction products corresponding to the catalyst 10% Ru(4)/Fe(1) system showed a high conversion of 90% and 12% selectivity towards cetyl alcohol, possibly due to the ability of the catalyst to store more selective H<sub>2</sub> promoted by metal-support interactions.

**Key words:** palm oil, hydrogenation, cetyl alcohol, methyl palmitate, titania, ruthenium, iron.

### INTRODUCCIÓN

El consumo de energía es una necesidad básica para la subsistencia del hombre, pues los combustibles a base de petróleo, el gas natural y el carbón siguen siendo principalmente los más usados. Un sustituyente amigable con el medio ambiente es el biodiesel que se obtiene a través de la transesterificación de ácidos grasos siendo una alternativa de fácil degradación, renovable y no tóxico<sup>1</sup>. Se han empleado diversas materias primas para su obtención, siendo los más destacados la palma, la soya y el girasol. En el Perú la mayor fuente de aceite vegetal es la palma, cuyo uso es como aceite comestible y potencialmente para obtener biodiesel. Para mejorar las propiedades del biodiesel de palma hay que retirar la fracción de palmitato de metilo, y para dar un mayor valor agregado a este, puede transformarse mediante hidrogenación catalítica selectiva en alcohol cetílico, un producto con amplia aplicación en la industria cosmética, también como agente antiadherente y espesante<sup>2,3</sup>.

La hidrogenación de ésteres metílicos fue estudiada por Huang, C. y col., que realizaron experimentos para la hidrogenación de palmitato de metilo en un reactor batch con presión de

hidrógeno gaseoso hasta 5,5 MPa desde los 250 °C hasta los 300 °C y agitación a 1000 rpm. A 270 °C, el catalizador de Pd-Cu/diatomita mostró su mejor rendimiento obteniendo una conversión de 98,8 % y una selectividad de 83,9 % a alcohol cetílico<sup>4</sup>. La fase activa utilizada para la hidrogenación corresponden a los metales de transición del grupo VIII B como el Pt, Rh y Ru, pues son capaces de quimisorber disociativamente el hidrógeno molecular<sup>5</sup>. Además, la adición de un segundo metal como el Fe, Sn, Cu, Ni promueve la actividad en posición carbonílica desfavoreciendo la hidrogenación de los enlaces C=C<sup>6-8</sup>.

Los soportes basados en óxidos reducibles como el  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{WO}_3$  y  $\text{MoO}_3$  mejoran la actividad y selectividad de reacciones de hidrogenación, este efecto se atribuye a la interacción fuerte metal-soporte (efecto SMSI) debido a que la reducción del soporte a altas temperaturas permite la migración de especies  $\text{TiO}_x$  (para el caso de la titania) sobre la superficie del catalizador, ocasionando su interacción con el metal soportado<sup>9,10</sup>. La síntesis de soportes ha sido muy estudiada, entre ellas, el método sol-gel ha sobresalido porque permite mejorar sus propiedades superficiales<sup>11-13</sup>, por ejemplo, el estudiado por Shee D., y col. que aplicaron el método sol-gel para la síntesis de varios óxidos mixtos, permitiendo aumentar la estabilidad térmica y el área superficial de 90 %  $\text{TiO}_2$ - $\text{SiO}_2$  ( $212 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ ) con respecto al método de impregnación incipiente ( $120 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ )<sup>14</sup>.

En la actualidad, el uso de alcohol cetílico obtenido de la grasa de las ballenas ha ocasionado la disminución de la población de esta especie marina, generando un desbalance en el equilibrio biológico y el rechazo de las sociedades protectoras de animales. Por ello, este trabajo propone la obtención artificial del alcohol cetílico mediante métodos catalíticos a partir de una fuente vegetal como el aceite de palma, que, por un lado, permite aumentar el valor agregado del aceite de palma y por el otro, desarrollar una tecnología económica ideal para preservar las especies cetáceas y la biodiversidad marina.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Síntesis del soporte por el método sol-gel

El soporte presenta un rol importante para la actividad y selectividad catalítica de la reacción debido a su capacidad de dispersar la fase metálica con el fin de aumentar los sitios activos para mejorar la actividad de la reacción. La síntesis de la titania por el método sol gel fue escogido en este trabajo porque permite obtener soportes con mejores propiedades texturales. La preparación fue la siguiente: En 274 mL de 2-propanol como solvente, se ajustó la temperatura entre 0 y 5 °C en un baño de hielo para impedir la reacción en la disolución. Inmediatamente, se agregó 18,5 mL de tetraisopropóxido de titanio manteniendo la agitación constante. A continuación, se introdujo en la disolución por goteo lento 24 mL de una solución de ácido nítrico<sub>(cc)</sub>:agua (1:23 mL), observando la formación del sol hasta la formación del gel. Luego, el gel se dejó reposar por 24 h a temperatura ambiente, después a 60°C se evaporó el solvente. Finalmente, se calcinó a 450°C por 5 h con rampa de 1°C/min y el polvo obtenido se tamizó en una malla de 100µm.

### Preparación del catalizador soportado por coimpregnación húmeda

Los catalizadores soportados se prepararon por el método de coimpregnación húmeda. Se pesó 1 g de soporte de  $\text{TiO}_2$  sol-gel. Luego, se agregaron diferentes disoluciones acuosas de las sales de Ru y Fe, según la Tabla 1. Se llevó la mezcla a ultrasonido por 15 minutos y agitación constante por 2 h para evitar la aglomeración de las partículas y promover la dispersión homogénea del metal activo sobre el soporte, respectivamente. La mezcla se colocó en un rotavapor hasta la sequedad y se lavó con etanol tres veces. Después, se calcinó el sólido a 400 °C por 5 h empleando una rampa de 1 °C/min y el polvo obtenido se tamizó en malla de 100  $\mu\text{m}$ . Finalmente, se redujo el sólido con flujo de 10 %  $\text{H}_2/\text{N}_2$  en fase gaseosa a 350 °C por 4 h. El catalizador reducido fue almacenado hasta su uso en atmósfera inerte (He) para evitar la oxidación.

### Caracterización del soporte y los catalizadores

#### 1. Análisis termogravimétrico (TGA).

Para el análisis termogravimétrico del soporte se tuvo que tomar la muestra en su etapa de gel para estudiar la hidrólisis, condensación y calcinación durante el proceso sol-gel. La variación de la masa con respecto a la temperatura fue analizada por esta técnica usando el equipo Perkin Elmer simultaneous thermal analyzer (STA 6000). La muestra se calentó desde los 35 °C hasta los 600 °C con una rampa de 10 °C/min en una atmósfera de  $\text{N}_2(\text{g})$  con flujo de 20 mL /min.

#### 2. Espectroscopia IR (FITR).

El espectro IR muestra los grupos funcionales del soporte. Las vibraciones de estos grupos son asignados de acuerdo con su longitud de onda característica. Los análisis IR fueron realizados en un equipo FTIR– Alpha Fourier Transform Infrared Spectrometer–Bruker. Se obtuvieron los espectros IR a diferentes tratamientos térmicos de 60, 200 y 350 °C para el soporte para verificar la presencia del solvente desplazado a diferentes temperaturas.

**Tabla 1.** Catalizadores basados en Ru-Fe soportados en  $\text{TiO}_2$ , donde Ru(a)Fe(b), a:b es la relación molar entre Ru:Fe.

% Carga metálica/Catalizador*	Peso en g $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	Peso en g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
10 % Ru(1)	0,2052	-
1 % Ru(4)Fe(1)	0,0180	0,0059
5 % Ru(4)Fe(1)	0,0902	0,0294
10 % Ru(4)Fe(1)	0,1803	0,0588
10 % Ru(1)Fe(1)	0,1322	0,1723

\*La carga metálica se calculó por el porcentaje en peso de todo el metal con respecto al peso del soporte

### 3. Sorción de N<sub>2</sub> (método BET)

El análisis superficial se realizó luego de la etapa de calcinación en el equipo Micromeritics GEMINI VII utilizando N<sub>2</sub> como gas de análisis (gas N<sub>2</sub>, 99 % LINDE) y nitrógeno líquido (TECNOGAS) con punto de ebullición a -195,79 °C como refrigerante para la condensación del N<sub>2</sub> a 77 K. Antes de la caracterización se desgasificó a 200 °C en flujo de He durante 2 h. El área BET se calculó en el rango de presiones p/p<sub>0</sub> entre <0,05 a 0,33> correspondiente a la adsorción de una monocapa. Los puntos de equilibrio se midieron siguiendo el programa GAS MICROMERITICS con un total de 50 puntos en el rango: 0,09 ≤ P/Po ≤ 0,98 y con un tiempo de equilibrio en cada punto de 7 s. Para calcular el área superficial se usó el método de Brunauer-Emmett-Teller (BET) según la ecuación<sup>15</sup>:

$$\frac{\frac{p}{p_0}}{V_a \left(1 - \frac{p}{p_0}\right)} = \frac{1}{V_m c} + \frac{(c-1)p}{V_m c p_0}$$

Donde  $V_a$  = volumen adsorbido a una presión, p;  $V_m$  = volumen adsorbido en la monocapa;  $p_0$  = presión saturada del N<sub>2</sub>;  $c$  = constante relacionada con el calor de adsorción.

### 4. Difracción de rayos X (XRD)

La difracción de rayos X muestra las fases cristalinas que existen en los sólidos. Para los análisis se usó un equipo de difracción de rayos X – D2 PHASER BRUKER y se empleó la radiación correspondiente a la transición de CuKα ( $\lambda = 0.154184$  nm) con un rango angular 2θ de 10 a 80° a 0,05 °/s, 30 kV y 10 mA.

### 5. Reducción a temperatura programada-H<sub>2</sub> (TPR)

La reducción de los catalizadores fueron analizadas por la técnica de reducción a temperatura programada usando un equipo TPR/TPD ChemiSorb 2720 Micromeritics provisto de un detector de termoconductividad. El material se calentó hasta los 200°C con un flujo de He por 30 min para desgasificar. Luego el sistema se enfrió hasta la temperatura ambiental usando una corriente de 50 ml/min de hidrógeno (10%H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>) y finalmente se calentó con una rampa de 10 °C/min hasta los 800°C.

### 6. Desorción a temperatura programada de H<sub>2</sub> (TPD-H<sub>2</sub>)

Los perfiles de desorción de H<sub>2</sub> (TPD-H<sub>2</sub>) fueron analizadas por la técnica de desorción a temperatura programada usando un equipo TPR/TPD ChemiSorb 2720 Micromeritics provisto de un detector de termoconductividad. El material se calentó hasta los 200°C con un flujo de He por 30 min para desgasificar, luego se incrementó la temperatura hasta 350°C por 4 h en flujo de 50 mL /min de H<sub>2</sub> (10%H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>) y después se enfrió hasta la temperatura ambiental. Finalmente, se calentó hasta 800 °C con una rampa de 10 °C/min con un flujo de He a 50 mL /min.

### 7. Cromatografía de gases (GC)

El registro cuantificado de los productos de reacción fue realizado en un cromatógrafo de gases GC-Varian-450, equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar Superlcowax 10, (30 m x 0,53 mm x 0,25 μm). La cuantificación es mediante un estándar externo.

### Actividad de los catalizadores

El estudio de la actividad se realizó en un reactor tipo batch. Se agregó al reactor 6 g de palmitato de metilo, 80 mL de dodecano, 200 mg de catalizador y una pastilla magnética. Luego, se abrió la llave de  $N_{2(g)}$  hasta los 400 psi con agitación a 1000 rpm y se dejó reposar 1 h. En caso de fuga de gas se volvió a ajustar el reactor hasta asegurar la total hermeticidad del sistema. Después, se despresurizó el reactor hasta presión atmosférica para purgar el nitrógeno inicial. Finalmente, se abrió la llave de  $H_{2(g)}$  hasta los 420 psi y se calentó hasta los 280 °C llegando a los 5,5 MPa. Se tomó una muestra cada hora de la reacción mediante una válvula de muestreo para la cuantificación de los productos de reacción en el cromatógrafo de gases luego de centrifugarlas para sedimentar el residuo de catalizador remanente. La conversión, selectividad y rendimiento se determinaron por las expresiones 1, 2 y 3, respectivamente.

$$\text{Conversión (\%)} = \frac{(\text{mol } C_{17}H_{34}O_2 \text{ inicial} - \text{mol } C_{17}H_{34}O_2 \text{ final}) \times 100}{\text{mol } C_{17}H_{34}O_2 \text{ inicial}} \dots (1)$$

$$\text{Selectividad (\%)} = \frac{(\text{mol } C_{16}H_{34}O_2 \text{ obtenido}) \times 100}{(\text{mol } C_{17}H_{34}O_2 \text{ inicial} - \text{mol } C_{17}H_{34}O_2 \text{ final})} \dots (2)$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = (\text{conversión} \times \text{selectividad}) / 100 \dots (3)$$

En la tabla 2 se presenta un resumen de las condiciones de hidrogenación del palmitato de metilo que se usó en este trabajo.

**Tabla 2.** Condiciones de la reacción de hidrogenación del palmitato de metilo.

Palmitato de metilo	6 g
n-dodecano	80 mL
Masa del catalizador	200 mg
Presión de $H_2$	5,5 MPa
Temperatura de reacción	280 °C

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización del soporte por sorción de $N_2$ (método BET), DRX, TGA y FTIR

#### 1. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico mostró tres etapas del método sol-gel desde la formación del sol hasta su óxido. La síntesis del soporte comienza con la hidrólisis que tiene como subproducto a 2 – propanol siendo su punto de ebullición de 82 °C, por ello, la pérdida de la masa en el tramo 1 (4,9 % en peso) se atribuyó a su evaporación (ecuación 1). En la sinéresis se encoge el gel causando la condensación de las moléculas de agua observándose una descomposición térmica lineal a los 100 °C (ecuaciones 2 y 3), ocasionando la siguiente pérdida de masa en el tramo 2 (16,3% en peso). La formación de enlaces Ti-O-Ti en la etapa de polimerización presenta enlaces isopropoxi unidos al átomo de Ti (ecuación 4), los cuales son eliminados por evaporación y combustión desde los 100 hasta los 350 °C como se muestra en el tramo 3 (8,6 % en peso). Finalmente, en el tramo 4 se presenta la formación del óxido en la etapa de calcinación desde los 350 hasta los 600 °C siendo aproximadamente estable la masa con respecto al aumento de la temperatura<sup>16</sup>.

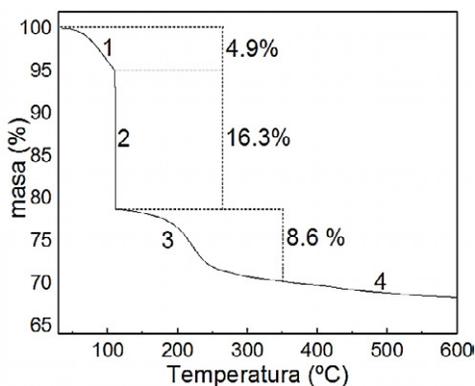
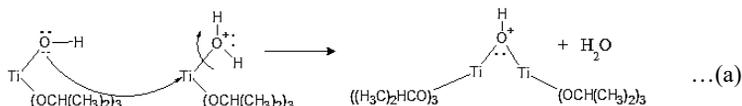
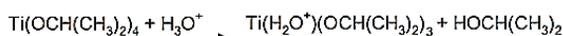
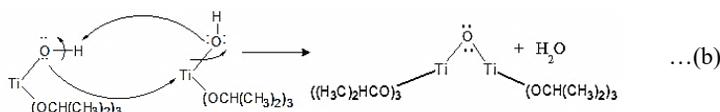


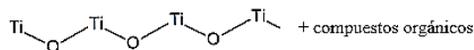
Figura 1. Análisis termogravimétrico del TiO<sub>2</sub> sol-gel.



Ecuación 1. Hidrólisis: Formación de puente OH y H<sub>2</sub>O.



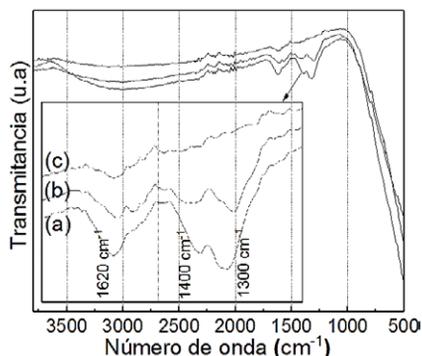
Ecuaciones 2 y 3. (a) Olación: Formación de puentes OH y (b) Oxolación: Formación de puentes O.



Ecuación 4. Etapa de polimerización.

## 2. Espectroscopía FTIR

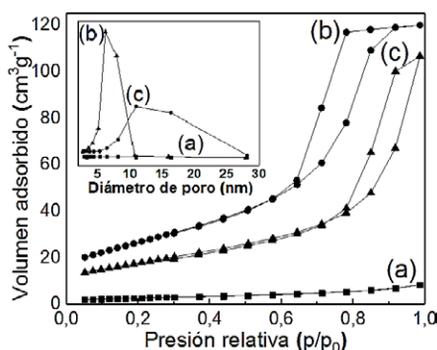
A los 60 °C, en el espectro IR aparecen bandas en posiciones a 1300 - 1400 y 1620 cm<sup>-1</sup>, que son asociados a las vibraciones de los enlaces C-C y C-O de los ligandos isopropoxi unidos al Ti y una banda por debajo de los 600 cm<sup>-1</sup>, que es característica de los óxidos metálicos O-Ti-O. A los 200 °C, aún se siguen observando los bandas, pero con menos intensidad. Sin embargo, a los 350 °C desaparecen quedando solo la banda del óxido metálico, por lo que esta temperatura se fijó como mínima de calcinación para el soporte.



**Figura 2.** Espectro FTIR de  $\text{TiO}_2$  sol-gel con tratamiento térmico a (a)60, (b)200 y (c)350 °C.

### 3. Sorción de $\text{N}_2$ (método BET)

El análisis de sorción  $\text{N}_2$  muestra las áreas superficiales de  $\text{TiO}_2$  calcinadas a 450 y 500 °C para ser comparadas con el comercial.



**Figura 3.** Isothermas de sorción  $\text{N}_2$  y distribución del tamaño promedio de poro por el método BJH de: (a) $\text{TiO}_2$  comercial,  $\text{TiO}_2$  sol-gel calcinadas a (b)450 °C y (c)500 °C.

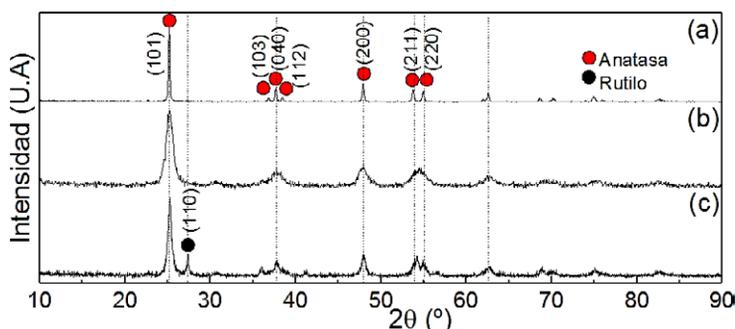
Al analizar las isothermas de adsorción, la muestra de  $\text{TiO}_2$  comercial presenta una isoterma del tipo IV y su región de sorción presenta poca histéresis, característico de los sólidos mesoporosos de baja área superficial. Sin embargo, el  $\text{TiO}_2$  sol-gel presenta isothermas de tipo IV (según IUPAC), lo que indica un sólido con superficie mesoporosa con un loop de histéresis tipo H1, característico de poros cilíndricos. Los soportes calcinados a 450 °C y 500 °C empiezan su histéresis en 0,6 y 0,7 de presión relativa, respectivamente. Como se observa, el análisis textural mostró gran aumento del área superficial del  $\text{TiO}_2$  (96  $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ ) preparado por el método sol - gel calcinado a 450 °C con respecto al comercial (9  $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ ), un aumento significativo del volumen de poro del  $\text{TiO}_2$  sol-gel (0,19  $\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ ) contra el comercial (0,01  $\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ ). Además, la figura 3 muestra la distribución promedio del tamaño de poro (según BJH) más homogénea en la superficie de la titania sol-gel. En este trabajo se usó el soporte  $\text{TiO}_2$  sol-gel para asegurar mejor dispersión metálica en la preparación de los catalizadores. En la tabla 3 se presenta un resumen de las características texturales de los soportes estudiados.

**Tabla 3.** Datos de la superficies específicas, el diámetro promedio, volumen de poro, porcentaje de fase anatasa y tamaño de cristalita de  $\text{TiO}_2$  (Ecuación Debye-Scherrer)

Soporte	Temperatura de calcinación	$S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ )	Diámetro promedio de poro (nm)	Volumen de poro ( $\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ )	%Anatasa	D (nm)
<b>TiO<sub>2</sub> comercial</b>	-	9	5	0,01	99	41
<b>TiO<sub>2</sub> sol-gel</b>	500 °C	63	10	0,17	66	14
<b>TiO<sub>2</sub> sol-gel</b>	450 °C	96	8	0,19	80	8

#### 4. Difracción de rayos X (XRD)

La figura 4 muestra los difractogramas de los soportes de titania comercial y sintetizado por sol-gel, calcinados a 450 y 500 °C. El soporte presenta como fase predominante a la anatasa con picos principales en 25,3°, 36,9°, 37,8°, 38,6°, 48,1°, 53,9° y 55,1° atribuidos a los planos (101), (103), (040), (112), (200), (211) y (220), respectivamente. Se encontraron picos relacionados a la fase rutilo en el difractograma del soporte calcinado a 500 °C a los 27,5° correspondiente al plano (110). El tamaño de cristalita se calculó en base al pico de mayor intensidad usando la fórmula de Debye-Scherrer. A mayor temperatura de calcinación se observó el ensanchamiento en los picos de difracción debido a la formación de partículas más pequeñas con mayor área superficial.

**Figura 4.** Difractogramas de los soportes: (a)  $\text{TiO}_2$  comercial y  $\text{TiO}_2$  sol-gel calcinado a (b) 450°C y (c) 500 °C.

Los difractogramas muestran características cristalinas correspondientes a las fases anatasa y rutilo, y la intensidad de la fase anatasa es mayor en el comercial. El porcentaje de las fases cristalinas contenidas en las muestras se determinó utilizando la ecuación de Spurr:

$$P_A = \frac{I_A}{I_A + 1.625I_R} \times 100$$

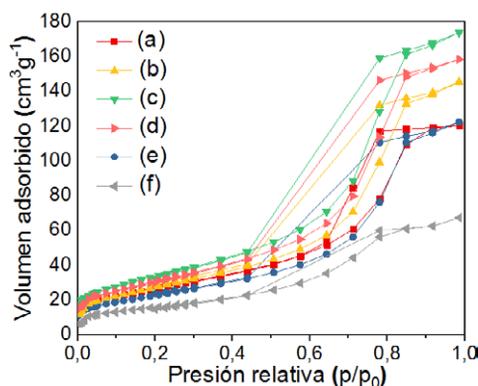
**Ecuación 5.** Ecuación de Spurr para cuantificar el porcentaje de fase cristalina.

Donde  $P_A$  es el porcentaje de la fase anatasa;  $I_A$  la intensidad integral del pico (101) de la fase anatasa;  $I_R$  la intensidad integral del pico (110) de la fase rutilo, obteniendo de fase anatasa un porcentaje de 80 % en el  $TiO_2$  sol-gel calcinado a 450 °C y 99 % en el comercial. Al aumentar la temperatura del soporte el % anatasa disminuyó (tabla 3). Se seleccionó el sol-gel calcinado a 450°C por tener mejor superficie y un % adecuado de anatasa según referencias<sup>15</sup>.

## Caracterización de los catalizadores por sorción de N<sub>2</sub>, DRX, TPR y TPD-H<sub>2</sub>

### 1. Sorción N<sub>2</sub> (método BET).

La figura 5 muestra los análisis BET de los catalizadores calcinados a 400 °C utilizados en este trabajo de investigación. El aumento de la carga metálica produce una disminución en el área superficial y el volumen de poro de los catalizadores lo cual indica que la fase activa se depositó en los poros del soporte. Todos los catalizadores en la figura 5 presentan isotermas de tipo IV, característico de las superficies micro-mesoporosas, con mayor proporción en la fase mesoporosa y con ciclos de histéresis tipo H1, correspondiente a poros cilíndricos<sup>16</sup>. La tabla 4 resume las características texturales de los catalizadores soportados.



**Figura 5.** Isotermas de sorción de N<sub>2</sub> de: (b)10%Ru(0), (c)1%Ru(4)Fe(1), (d)5%Ru(4)Fe(1), (e)10%Ru(4)Fe(1), (f)10%Ru(1)Fe(1) comparados con el (a)TiO<sub>2</sub>.

**Tabla 4.** Superficie específica, diámetro promedio de poro (método BJH), volumen de poro de los catalizadores soportados en TiO<sub>2</sub> sol gel y tamaño de cristalita (D).

Catalizador	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Diámetro poro (nm)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	D(nm)
<b>10 %Ru(1)</b>	102	9	0,24	9,0
<b>1 %Ru(4)Fe(1)</b>	120	9	0,27	8,7
<b>5 %Ru(4)Fe(1)</b>	99	9	0,22	8,7
<b>10 %Ru(4)Fe(1)</b>	82	9	0,19	9,2
<b>10 %Ru(1)Fe(1)</b>	57	7	0,10	8,0

## 2. Difracción de rayos X (XRD)

Los difractogramas de los catalizadores soportados muestran picos de  $\text{RuO}_2$  a los  $28^\circ$  (110),  $35^\circ$  (101) y  $54^\circ$  (211) de baja intensidad, por ende, a pesar de su alta carga metálica, se encuentran altamente dispersos en los poros del soporte con posibles aglomeraciones en la superficie<sup>17</sup>. Al aumentar la carga metálica del 1, 5 y 10 % aparece el pico correspondiente a  $\text{RuO}_2$ . Los difractogramas presentan la misma estructura de la fase anatasa de la titanía con un aumento del tamaño de cristalita a medida que aumenta la carga metálica. En catalizador con mayor carga de Fe (en la figura 6, el difractograma f) a los  $30,6^\circ$  se presenta un pico posiblemente debido a las especies de  $\text{FeO}_x$  adsorbidos en el soporte.

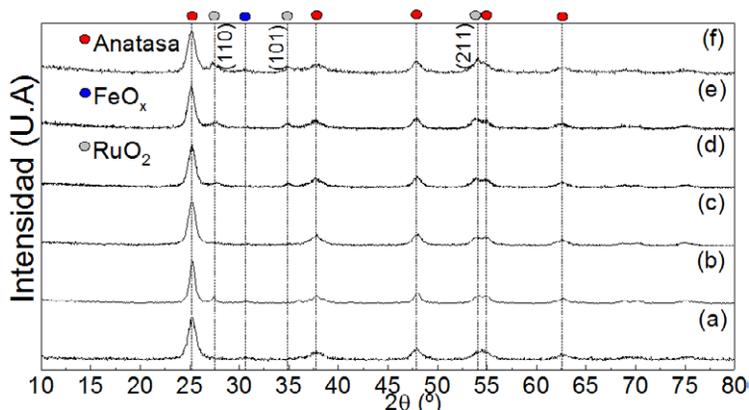
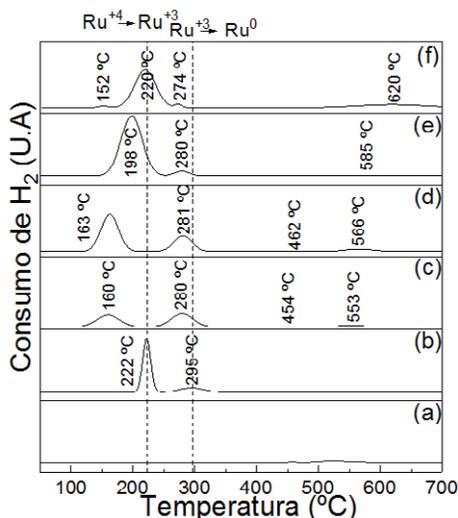


Figura 6. Difractogramas del soporte (a)  $\text{TiO}_2$  y los catalizadores de Ru-Fe: (b) 10%Ru(1), (c) 1%Ru(4)Fe(1), (d) 5%Ru(4)Fe(1), (e) 10%Ru(4)Fe(1), (f) 10%Ru(1)Fe(1).

## 3. Reducción a temperatura programada (TPR- $\text{H}_2$ )

En la figura 7 el perfil de reducción para el catalizador monometálico de 10 % Ru(1) muestra un pico máximo a  $222^\circ\text{C}$  y un pico de leve intensidad a los  $295^\circ\text{C}$ , que son atribuidos a la reducción de los estados de oxidación de +4 a +3 y +3 a 0 para el Ru, respectivamente. Para los óxidos mixtos, el aumento de la carga metálica (1, 5 y 10 % - c, d y e en la figura 7) ocasiona el desplazamiento de los picos hacia altas temperaturas. Considerando la misma carga metálica al comparar los catalizadores 10%Ru(4)Fe(1), (muestra e) y 10%Ru(1)Fe(1) (muestra f) se observa un desplazamiento de los picos a mayores temperaturas, al aumentar la presencia de hierro en el catalizador posiblemente debido a interacciones metal-soporte<sup>18</sup>. Como se observa, el  $\text{TiO}_2$  no presenta ningún pico de reducción hasta los  $700^\circ\text{C}$ . Según los termogramas TPR se ha establecido  $350^\circ\text{C}$  como temperatura de reducción para todos los catalizadores soportados pues a esta temperatura se asegura la total reducción a Ru metálico.



**Figura 7.** Perfiles TPR-H<sub>2</sub> del soporte (a)TiO<sub>2</sub> y los catalizadores calcinados a 400 °C: (b)10%Ru(1), (c)1%Ru(4)Fe(1), (d)5%Ru(4)Fe(1), (e)10%Ru(4)Fe(1) y (f)10%Ru(1)Fe(1)

#### 4. Desorción a temperatura programada (TPD-H<sub>2</sub>)

Los perfiles de desorción de hidrógeno muestran la existencia de 3 sitios de adsorción de hidrógeno para los catalizadores mixtos y solo 2 sitios de adsorción para su contraparte monometálica. El primer sitio de adsorción de hidrógeno se debe a la desorción entre los 400 y 500 °C la cual se atribuye a los hidrógenos quimisorbidos por la fase activa, debido a su alta temperatura de desorción indica una fuerte quimisorción entre H y Ru. A los 594 °C se presenta un pico de mayor intensidad, indicando que en este segundo sitio la adsorción es lenta y hay acumulación de hidrógeno que se difunde en el soporte evidenciando una interacción metal-soporte para el catalizador monometálico<sup>18</sup>. Para los catalizadores mixtos se presenta un tercer sitio de adsorción con un pico máximo a los 648 °C, posiblemente debido a la influencia de Fe. La temperatura de reacción para la hidrogenación de palmitato de metilo se realiza a los 280 °C que, como se observa en la figura 8, la desorción de hidrógeno inicia todavía a los 400 °C, indicando que la fase activa está saturada de hidrógeno; esto podría favorecer la actividad en la reacción.

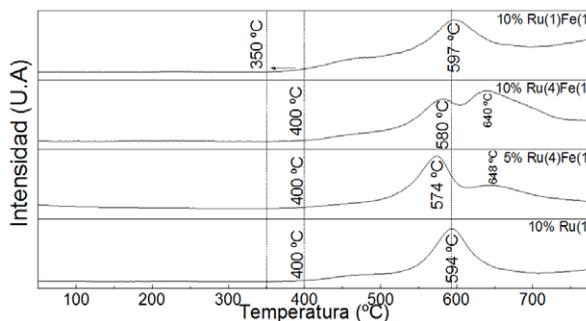


Figura 8. Perfiles TPD-H<sub>2</sub> de los catalizadores basados en Ru-Fe.

### Actividad catalítica de los catalizadores

Los productos de reacción de la hidrogenación del palmitato de metilo obtenidos en el presente trabajo fueron alcohol cetílico, pentadecano y hexadecano. La conversión de palmitato de metilo para los catalizadores fue mayor para el catalizador 10% Ru(4)Fe(1) en 4 h de reacción, debido a que presenta mayor cantidad de fase activa (Ru) depositado en el soporte. Además, los perfiles de reducción de las muestras mixtas mostraron que el consumo de hidrógeno es directamente proporcional a la carga metálica y los perfiles de desorción de hidrógeno revelaron el efecto de una posible interacción metal-soporte. La adición de Fe para el catalizador de 10% Ru(4)Fe(1) promovió la selectividad hacia alcohol cetílico, debido a que presenta orbitales “d” vacíos, los cuales actúan como sitios ácidos de Lewis, activando el grupo carbonilo (C=O) presente en las moléculas de palmitato de metilo<sup>19</sup>.

### Efecto de la carga metálica

La figura 9 muestra el efecto de la carga metálica sobre la conversión y selectividad para la hidrogenación de palmitato de metilo. El catalizador de más baja carga metálica, 1% Ru(4)Fe(1), presenta la conversión más baja de 18 % y baja selectividad de 4 %, sin embargo, al aumentar la carga metálica la conversión y selectividad aumentan gradualmente hasta 90 % y 12 %, respectivamente, para el catalizador 10% RuFe(4:1). Por tanto, el rendimiento del alcohol cetílico alcanza el 10,8 % a 4 h de reacción. Los resultados de la reacción de hidrogenación de palmitato de metilo evaluando el efecto de la carga metálica son mostrados en la tabla 5.

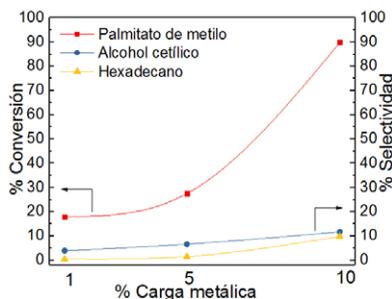


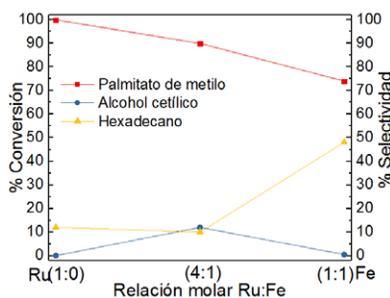
Figura 9. Efecto de la carga metálica de los catalizadores mixtos en la conversión y selectividad para la hidrogenación de palmitato de metilo a 4 h de reacción.

**Tabla 5.** Conversión y selectividad de los catalizadores en la hidrogenación de palmitato de metilo a 4 h de reacción.

Catalizador (h)	Conversión palmitato de metilo (%)	Selectividad alcohol cetílico (%)	% Rendimiento alcohol cetílico	Selectividad hexadecano (%)
<b>1 % RuFe(4:1)</b>	18	3,9	0,7	1
<b>5 % RuFe(4:1)</b>	28	6,6	1,8	2
<b>10 % RuFe(4:1)</b>	<b>90</b>	<b>12</b>	<b>10,8</b>	<b>10</b>

### Efecto de la relación molar Ru/Fe

La figura 10 muestra el efecto de la relación molar Ru/Fe sobre la conversión y selectividad hacia alcohol cetílico para la hidrogenación de palmitato de metilo. Se fijó una carga metálica de 10 % y se evaluó distintas relaciones molares Ru/Fe. El catalizador monometálico 10 % Ru(1)Fe(0) presenta 100 % de conversión, pero no es selectivo debido a la hidrogenólisis hacia hidrocarburos como pentadecano y hexadecano. Si bien, la adición de Fe aumenta la selectividad hasta 12 % para el catalizador 10 % Ru(4)Fe(1), sin embargo, para el catalizador de 10 % Ru(1)Fe(1) disminuye la selectividad debido probablemente a la presencia de aglomeraciones de FeOx evidenciado en su difractograma (figura 6) y posiblemente inhiben la actividad hidrogenante del Ru debido al desplazamiento hacia bajas temperaturas de desorción de hidrógeno de los catalizadores soportados a 350 °C respecto al catalizador monometálico en su primer sitio de adsorción (figura 8). Las actividades y selectividades hacia alcohol cetílico en la hidrogenación del palmitato de metilo evaluando el efecto de la relación molar Ru/Fe se presentan en la tabla 6.

**Figura 10.** Efecto de la relación molar entre Ru:Fe en la conversión y selectividad para la hidrogenación de palmitato de metilo a 4 h de reacción.**Tabla 6.** Efecto de la relación molar Ru/Fe en la conversión y selectividad a alcohol cetílico de los catalizadores soportados en la hidrogenación de palmitato de metilo a 4 h de reacción.

Catalizador (h)	Conversión palmitato de metilo (%)	Selectividad alcohol cetílico (%)	% Rendimiento alcohol cetílico	Selectividad hexadecano (%)
<b>10 % Ru(1)Fe(1)</b>	74	0,5	0,4	48
<b>10 % Ru(4)Fe(1)</b>	<b>90</b>	<b>12</b>	<b>10,8</b>	<b>10</b>
<b>10 % Ru(1)Fe(0)</b>	100	0	0	37

### Efecto de la interacción metal-soporte

La titanía es un óxido reducible que puede promover interacciones metal-soporte en la superficie, evidenciado en los perfiles TPD de  $\text{H}_2$ . Este efecto consiste en la exposición del soporte a alta temperatura y presión de  $\text{H}_2$  molecular, esto conlleva a la reducción de los iones  $\text{Ti}^{+4}$  hacia  $\text{Ti}^{+3}$  lo cual provoca una interacción con el metal activo Ru creando vacantes superficiales, las cuales favorecen la formación de sitios ácidos selectivos para la hidrogenación específica en posición carbonílica del palmitato de metilo<sup>20</sup>. El palmitato de metilo ( $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ) es un metiléster con un enlace doble en el grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ), donde los pares libres de electrones presentes en el oxígeno son atraídos por los sitios ácidos creados por las vacantes superficiales en el soporte y el promotor de Fe. Entonces, la superficie del catalizador es descrita por la interacción metal-soporte y la quimisorción del hidrógeno por el Ru, evidenciado por los perfiles TPD- $\text{H}_2$  (figura 8).

## CONCLUSIONES

La titanía preparada por el método sol-gel presentó mejores propiedades texturales: superficie específica ( $96 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ ), volumen de poro ( $0,19 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ ) y una mejor distribución promedio del tamaño de poro para mejorar la deposición dispersa de la fase activa. Los difractogramas de los catalizadores mostraron que los metales depositados en la superficie del soporte se encuentran altamente dispersos en los poros con posibles aglomeraciones en la superficie del soporte. Los perfiles de desorción de hidrógeno revelaron una interacción metal-soporte mejorando la actividad catalítica. El catalizador 10 % Ru(4)Fe(1) tiene un alto consumo de hidrógeno, según su perfil de reducción para el metal activo, presentando una actividad del 90 % para la hidrogenación del palmitato de metilo y una selectividad máxima del 12 %, con un rendimiento del 10,8 % hacia alcohol cetílico. La adición de Fe como promotor mejoró drásticamente la selectividad hasta 12 %, en comparación con su contraparte monometálica, debido a la formación de sitios ácidos alrededor de Ru promoviendo la hidrogenación en posición carbonílica.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a: FONDECYT - Programa de Doctorado en Química (Proyecto N°237) y CienciActiva-FONDECYT (Proyecto N°219) por el financiamiento de esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ortiz MC, García P, Lagunes LM, Arregoitia MI, García R, León MA. Obtención de biodiesel a partir de aceite crudo de palma (*Elaeis guineensis* Jacq.). Aplicación del método de ruta ascendente. Acta Universitaria. 2016; 26(5): 3–10.
2. Altaie MAH, Janius RB, Taufiq-Yap YH, Rashid U. Basic properties of methyl palmitate-diesel blends. Fuel. 2017;193:1-6.
3. García D, Sandoval J, Saldaña R, Cárdenas G, Soplín JA, Sotero VA, et al. Fraccionamiento e interesterificación del aceite de palma (*Elaeis guineensis*) cultivado en la Amazonia peruana. Grasas y Aceites. 2008; 59(2): 104–109.
4. Huang C, Zhang H, Zhao Y, Chen S, Liu Z. Diatomite-supported Pd–M (M=Cu, Co, Ni) bimetal nanocatalysts for selective hydrogenation of long-chain aliphatic esters. J Colloid Interf Sci. 2012; 386(1): 60–65. 6.
5. Rojas M, Castañeda H, Cconislla JL, Neira E, Sun Kou R, Picasso G. Síntesis de catalizadores Ru-Ni soportados en  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para la hidrogenación de palmitato de metilo derivado del aceite de palma y conversión a alcohol cetílico. Rev Soc Quim Perú. 2018; 84(4): 522-535.
6. Guan Q, Wan F, Han F, Liu Z, Li W. Hydrodeoxygenation of methyl palmitate over MCM-41 supported nickel phosphide catalysts. Catal Today. 2016; 259(2): 467-473.
7. Miyake T, Makino T, Taniguchi S, Watanuki H, Niki T, Shimizu S, et al. Alcohol synthesis by hydrogenation of fatty acid methyl esters on supported Ru–Sn and Rh–Sn catalysts. Appl Catal A. 2009; 364(1–2): 108–112.
8. Bachiller-Baeza B, Guerrero-Ruiz A, Wang P, Rodríguez-Ramos I. Hydrogenation of Citral on Activated Carbon and High-Surface-Area Graphite-Supported Ruthenium Catalysts Modified with Iron. J Catal. 2001; 204(2): 450-459.
9. Dos Santos S, Silva A, Jordão E, Fraga M. Performance of RuSn catalysts supported on different oxides in the selective hydrogenation of dimethyl adipate. Catal Today. 2005; 107-108: 250-257.
10. Almeida L, Rocha ALA, Rodrigues T, Robles-Azocar P. Highly selective hydrogenation of levulinic acid catalyzed by Ru on TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> hybrid support. Catal Today. 13 diciembre 2018. in press. doi: 10.1016/j.cattod.2018.12.022.
11. Cruz-González N, Fernández J, Zapata-Torres M, García M. Efecto del gas utilizado en el tratamiento térmico y la impurificación con Eu en las propiedades estructurales de nanofibras de TiO<sub>2</sub> depositadas por electrohilado. Superficies y Vacío. 2013; 26(3): 111–116.
12. Rojas H, Murcia J, Borda G, Reyes P, Rojas N. Hidrogenación de acroleína y crotonaldehído sobre catalizadores de IR soportado. Acrolein and crotonaldehyde hydrogenation on IR-supported catalysts. DYNA. 2009; 76(159): 125–134.
13. Tavizón J. Evaluación catalítica y caracterización de sistemas de NiW/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-TiO<sub>2</sub> para hidrosulfuración profunda. [Tesis de Maestría]. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana; 2011.
14. Shee D, Mitra B, Chary KVR, Deo G. Characterization and reactivity of vanadium oxide supported on TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> mixed oxide support. Mol Catal. 2018; 451: 228–237.

15. Zikalala SA, Kuvarega AT, Mamba BB, Mhlanga SD, Nxumalo EN. The effect of synthetic routes on the physicochemical properties and optical response of N-doped titania-oxidized carbon nanotube nanohybrids. *Mater Today Chem.* 2018; 10: 1-18.
16. Luciani J. Actividad y selectividad de catalizadores de iridio soportados en titania, ceria y y-alúmina en la hidrogenación del crotonaldehido en un reactor continuo [Tesis de pregrado]. Lima, Perú: Universidad Nacional de Ingeniería; 2006.
17. Mendes MJ, Santos OAA, Jordão E, Silva AM. Hydrogenation of oleic acid over ruthenium catalysts. *Appl Catal A.* 2001; 217(1-2): 253-262.
18. Silva AM, Morales MA, Baggio-Saitovitch EM, Jordão E, Fraga MA. Selective hydrogenation of dimethyl adipate on titania-supported RuSn catalysts. *Appl Catal A.* 2009; 353(1): 101-106.
19. Zepeda TA, Martínez-Hernández A, Guil-López R, Pawelec B. Preferential CO oxidation in excess of hydrogen over Au/HMS catalysts modified by Ce, Fe and Ti oxides. *Appl Catal B.* 2010; 100(3-4): 450-462.
20. Abrokwah RY, Rahman MM, Deshmane VG, Kuila D. Effect of titania support on Fischer-Tropsch synthesis using cobalt, iron, and ruthenium catalysts in silicon-microchannel microreactor. *Mol Catal.* 2019; 478: 110566. doi: 10.1016/j.mcat.2019.110566

## **EFECTO DE LA TEMPERATURA DE SUSTRATO SOBRE LA ESTRUCTURA Y RESISTIVIDAD ELÉCTRICA DE PELÍCULAS DELGADAS DE NITRURO DE MOLIBDENO**

José Noé Valdivia Rodas<sup>a</sup>, Arturo Fernando Talledo Coronado<sup>b</sup>, Segundo Jáuregui Rosas<sup>a</sup>, Pedro De La Cruz Rodríguez<sup>a</sup>, Manuel Enrique Guevara Vera<sup>a</sup>

### **RESUMEN**

Películas delgadas de nitruro de molibdeno fueron depositadas sobre obleas de silicio (111) mediante la técnica de la pulverización catódica magnética reactiva DC, a la temperatura de sustrato de 100, 200, 300 y 400 °C, en la mezcla de gases ( $Ar+N_2$ ) a la presión de trabajo de  $4,3 \times 10^{-3}$  torr. La composición de las películas ha sido definida con espectroscopia Auger (AES). La difracción de rayos X muestra que tales películas presentan una orientación cristalográfica preferencial a lo largo del plano (112) y el tamaño de grano se incrementa desde 8,21 a 13,16 nm en el rango de 100 a 400 °C de la temperatura de sustrato. La resistividad de las películas disminuye con el aumento de la temperatura de sustrato desde 74,20 a  $2,45 \mu\Omega \cdot cm$  mostrando características óhmicas. El valor más bajo de la resistividad eléctrica fue de  $2,45 \mu\Omega \cdot cm$  a la temperatura de sustrato de 400 °C.

**Palabras clave:** películas delgadas, nitruro de molibdeno, Difracción de Rayos X, resistividad eléctrica, temperatura de sustrato.

## **EFFECT OF SUBSTRATE TEMPERATURE ON THE STRUCTURE AND ELECTRICAL RESISTIVITY OF THIN FILMS OF MOLYBDENUM NITRIDE**

### **ABSTRACT**

Thin films of molybdenum nitride were deposited on silicon wafers (111) by means of the DC reactive magnetic sputtering technique, at the substrate temperature of 100, 200, 300 and 400 °C, in the gas mixture ( $Ar+N_2$ ) at the working pressure of  $4,3 \times 10^{-3}$  torr. The composition of the films has been defined with Auger Electron Spectroscopy (AES). X-ray diffraction shows that such films have a preferential crystallographic orientation along the plane (112) and the grain size increases from 8,21 to 13,16 nm in the range of 100 to 400 °C the substrate

---

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, Perú.  
jrodas\_1770@yahoo.es

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru s/n Rímac, 1301 Lima, Perú.

temperature. The resistivity of the films decreases with increasing substrate temperature from 74,20 to 2,45  $\mu\Omega.cm$  showing ohmic characteristics. The lowest value of the electrical resistivity was 2,45  $\mu\Omega.cm$  at the substrate temperature of 400 °C.

**Key words:** Thin films, molybdenum nitride, X-ray diffraction, electrical resistivity, substrate temperature.

## INTRODUCCIÓN

Los nitruros y carburos de metales de transición son estructuras metálicas compactas en las que átomos de carbón o nitrógeno ocupan sitios intersticiales. La unión en su estructura involucra contribuciones simultáneas de enlace covalente, iónico y metálico para la energía cohesiva, que conduce a propiedades muy interesantes<sup>1</sup>.

Nitruro de molibdeno es uno de esos materiales que exhibe interesantes propiedades. Las películas delgadas de nitruro de molibdeno muestran alta conductividad eléctrica y estabilidad química y son candidatas prometedoras para uso como barreras de difusión de Cu y electrodos en microelectrónica<sup>2</sup>.

También, la película de Mo es una capa de barrera mejor que la película de TiN en prevención de la difusión del cobre hacia el óxido de silicio<sup>3</sup>. Para garantizar alta eficiencia de un dispositivo de célula solar basado en cobre-indio-(galio)-selenio (CIGS), se necesita un contacto óhmico posterior ideal para un mejor transporte de portadores de carga mayoritarios y baja recombinación de portadores de carga minoritarios<sup>4</sup>. Asimismo, células solares CdTe con nitruro de molibdeno en la estructura de contacto posterior poseen de manera consistente un mejor rendimiento en comparación a células con únicamente molibdeno en el contacto posterior<sup>5</sup>.

Además, nitruro de molibdeno muestra excelente dureza, capacidad catalítica y efectos de superconductividad. Diferentes métodos han sido probados para fabricación de capas de nitruro de molibdeno, incluyendo deposición de capa atómica, deposición asistida por iones, deposición de láser pulsado, implantación fuerte de iones nitrógeno, deposición de vapor química y nitruración de metal Mo a alta temperatura. En comparación con otros métodos, deposición por pulverización catódica reactiva parece ser una de las más efectivas para la fabricación de películas de óxido de metal de transición o de nitruro porque la composición química y de fase de la película depende mucho del Ar-O-N<sub>2</sub>. En cuanto al método de pulverización catódica magnetrón reactiva, se pueden crear películas de alta calidad incluso a relativamente baja temperatura de sustrato debido a la estimulación del plasma de la interacción iónica con la superficie del sustrato<sup>6</sup>.

Thakur *et al.*<sup>4</sup> reportan que la resistividad de películas delgadas de molibdeno sobre vidrio de cal sodada, zafiro, cuarzo y zirconia estabilizada con ytria (YSZ) usando pulverización catódica magnetrón dc a 400 °C muestran un comportamiento puramente metálico.

Asimismo, Chen *et al.*<sup>7</sup> han encontrado que incrementando la potencia de pulverización catódica DC de películas delgadas de molibdeno desde 200 a 500 W a 10 mTorr resulta una disminución en la resistividad desde  $78,09\mu\Omega.cm$  a  $31,35\mu\Omega.cm$  debido posiblemente a los cambios de tensiones residuales esfuerzos de tensión a compresión.

Las películas delgadas de molibdeno y nitruro de molibdeno se han utilizado ampliamente en varias áreas tecnológicas, y se han convertido en el paradigma de la tecnología actual y son uno de los temas más importantes para los grupos de investigación de punta. Nuestro objetivo en este trabajo fue analizar el efecto de la temperatura de sustrato sobre la estructura y resistividad eléctrica de películas delgadas de nitruro de molibdeno. La mezcla de gas reactivo fue optimizada para obtener la fase  $Mo_2N$  como componente principal de la película. La resistividad eléctrica de las películas delgadas de  $Mo_2N$  fue medido con el método de la probeta de cuatro puntas<sup>8</sup>.

## DETALLES EXPERIMENTALES

### Objeto de estudio

Las películas delgadas de nitruro de molibdeno obtenidas mediante pulverización catódica magnética reactiva DC sobre sustratos de silicio (111) y su variación de la estructura y resistividad eléctrica como respuesta a la temperatura de sustrato.

La población de estudio en la presente investigación fue de 5 películas delgadas, 4 muestras fueron películas delgadas de nitruro de molibdeno y una película delgada de molibdeno puro.

### Materiales

El material que se utilizó fue: Blanco de molibdeno con 7,62 cm de diámetro; 0,64 cm de espesor y 99,97 % de pureza para pulverización catódica; sustratos de silicio (111), gas argón y nitrógeno con una pureza de 99,99 %. La generación de las películas delgadas de nitruro de molibdeno se realizó mediante un sistema de pulverización magnética reactiva DC. Para las mediciones eléctricas se utilizó una sonda de cuatro puntas en conjunto con un nanovoltímetro Modelo Keithley 2182 A y una fuente de corriente modelo Keithley 6221 A.

### Síntesis de las películas delgadas

Antes de la deposición, los sustratos de silicio (111), de 2,9 cm x 1,5 cm cada uno fueron limpiados ultrasónicamente en una solución de alcohol de 96° durante 8 minutos y secado con aire caliente.

En el primer ensayo, se dispusieron varios sustratos de silicio (111) en cada uno de los tres compartimientos de un portasustrato, cada compartimiento estaba separado y debidamente protegido, en dos compartimientos para ser depositado nitruro de molibdeno a 400 °C y en el otro para ser depositado molibdeno puro también a 400 °C, y luego fueron introducidos en la cámara de vacío de un sistema de pulverización catódica magnética reactiva DC, figura 1. La distancia del sustrato al blanco de molibdeno fue de 8 cm. La cámara de vacío fue inicialmente

evacuada a una presión base de  $7,5 \times 10^{-7}$  torr, para lo cual había que hacer un proceso de desorción por dos horas, con la finalidad de eliminar la posible formación de vapor de agua en las paredes de la cámara, y la temperatura de sustrato se reguló a 400 °C. Seguidamente, se realizó una pre pulverización catódica durante 2 minutos. Para ello se introduce en la cámara gas argón hasta llegar a una presión de  $4,3 \times 10^{-3}$  torr con la finalidad de eliminar óxidos del blanco de Mo. Luego un flujo de argón fue introducido para mantener la presión durante la deposición a un valor de  $4,3 \times 10^{-3}$  torr, y también fue introducido en la cámara de vacío gas nitrógeno a la presión de  $2,6 \times 10^{-4}$  torr. La fuente de voltaje se reguló a un valor de 110 V y con una corriente de 400 mA. La pulverización catódica se realizó durante 10 minutos a uno de los compartimientos que contenía varios sustratos de silicio (111) a 400 °C. Luego externamente se rotaba el portasustrato para una adecuada ubicación del segundo compartimiento que también contenía obleas de silicio (111), al cual se realizó pulverización catódica durante 10 minutos a la temperatura de 400 °C. Seguidamente, se suspendió el flujo de gas nitrógeno y moviendo externamente el portasustrato para una orientación adecuada del tercer compartimiento con sustratos de silicio (111), se depositó molibdeno puro durante 10 minutos a la temperatura de 400 °C.

En ambas muestras la presión de gas argón fue de  $4,3 \times 10^{-3}$  torr y la de nitrógeno de  $2,6 \times 10^{-4}$  torr. Por lo que se obtuvieron películas delgadas de nitruro de molibdeno y de molibdeno a la temperatura de 400 °C.

En una segunda experiencia, en el mismo portasustrato mencionado anteriormente se dispusieron sustratos de silicio (111) en cada uno de los tres compartimientos, y luego de haber alcanzado una presión base de  $7,5 \times 10^{-7}$  torr en la cámara, así como de realizar la pre pulverización catódica durante 2 minutos; un flujo de gas argón a la presión de  $4,3 \times 10^{-3}$  torr y también gas nitrógeno a la presión de  $2,6 \times 10^{-4}$  torr fueron introducidos en la cámara de vacío. Con el mismo valor de voltaje y corriente considerado en el primer ensayo, y regulando la temperatura a 300 °C, se realizó pulverización catódica durante 10 minutos al primer compartimiento del portasustrato. Luego, girando el portasustrato desde la parte externa de la cámara de vacío para lograr una orientación adecuada del segundo compartimiento que contenía varias obleas de silicio (111), y una vez estabilizada la temperatura a 200 °C y con un flujo de gas argón a la presión de  $4,3 \times 10^{-3}$  torr y de gas nitrógeno a la presión de  $2,6 \times 10^{-4}$  torr se procedió a la pulverización catódica durante 10 minutos, respectivamente. Finalmente, a una orientación adecuada del tercer compartimiento y después de haber estabilizado la temperatura a 100 °C, se realizó la deposición durante 10 minutos a una presión de gas argón de  $4,3 \times 10^{-3}$  torr y de gas nitrógeno a  $2,6 \times 10^{-4}$  torr. La distancia del blanco de molibdeno al sustrato fue de 8 cm para cada temperatura considerada. Por lo que se obtuvieron películas delgadas de nitruro de molibdeno a las temperaturas de sustrato de 100, 200 y 300 °C, respectivamente.

En resumen se generaron películas delgadas de nitruro de molibdeno a 100, 200, 300 y 400 °C mediante pulverización catódica magnética reactiva DC, usando un blanco de Mo (7,62 cm de diámetro; 0,64 cm de espesor y pureza de 99,97 %); así como películas delgadas de molibdeno a la temperatura de 400 °C, a la presión de trabajo de  $4,3 \times 10^{-3}$  torr.

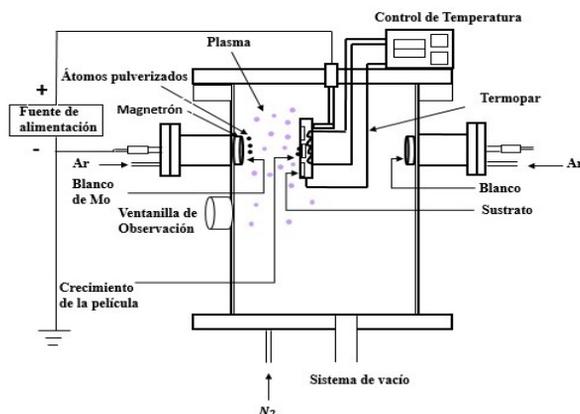


Figura 1. Sistema típico de deposición por pulverización catódica magnética reactiva DC.

### Métodos y técnicas

La caracterización de las muestras fue realizada mediante:

**Difracción de Rayos X (DRX).** La nanoestructura y orientación cristalográfica de las muestras fueron obtenidas mediante un difractómetro de rayos X Rigaku/Miniflex 600, operado en modo detector scan a 40 kV, 15 mA, con una fuente de radiación de la lámpara  $Cu - K\alpha 1$ , de longitud de onda  $\lambda = 1,540 \text{ \AA}$ , con un tamaño de paso de  $0,02^\circ$  y un tiempo de conteo de 1s por paso. El tamaño del cristalito (D) fue calculado usando la ecuación de Scherrer<sup>9</sup>:

$$D = \frac{0,9 \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (1)$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X usado,  $\beta$  es el ancho a la altura media del pico de difracción de la muestra y  $\theta$  es el ángulo de Bragg.

**Técnica de la sonda de cuatro puntas.** Para medir la resistividad eléctrica de las películas delgadas se usó la configuración estándar de cuatro puntas, que se muestra en la figura 2.

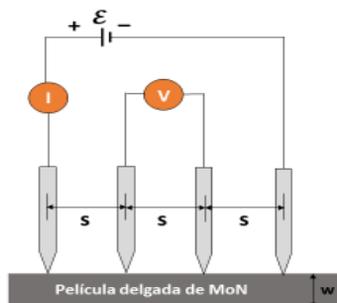


Figura 2. Esquema de la probeta de cuatro puntas para la medida de la resistividad eléctrica;  $\mathcal{E}$  es la fuente de intensidad de corriente, I la corriente aplicada, V la diferencia de potencial eléctrico registrada, w indica el espesor de la película delgada y s la separación entre electrodos<sup>10</sup>.

Para el caso de una geometría de cuatro puntas lineales con igual espaciado, la resistividad es dada por <sup>8</sup>:

$$\rho = \frac{\pi}{Ln2} w \frac{V}{I} \quad (2)$$

donde  $w$  es el espesor de la muestra,  $I$  la corriente aplicada y  $V$  el voltaje medido con el nanovoltímetro Modelo Keithley 2182 A.

**Espectroscopia electrónica Auger (AES).** AES representa hoy la herramienta de análisis químico de superficies más importante para muestras conductoras. La espectroscopia electrónica Auger está basada en el uso de electrones primarios con energías típicas entre 3 y 30 keV y la posibilidad para enfocar y explorar el haz electrónico primario en el rango de micrómetros y nanómetros analizando las capas atómicas más externas de la materia<sup>11</sup>. En el presente trabajo se utilizó dicha técnica para obtener la composición química de las muestras.

La composición de una muestra de  $n$  elementos puede ser calculado semicuantitativamente mediante la ecuación<sup>11</sup>:

$$x_A = \frac{I_A/S_A}{\sum(I_i/S_i)} \quad (3)$$

donde  $I_i$  son las intensidades de los picos elementales y  $S_i$  son los factores de sensibilidad respectiva,  $I_A$  la intensidad del pico Auger de un elemento A. Las medidas Auger reportadas en este artículo fueron hechas en el instrumento Riber MIQ 156.

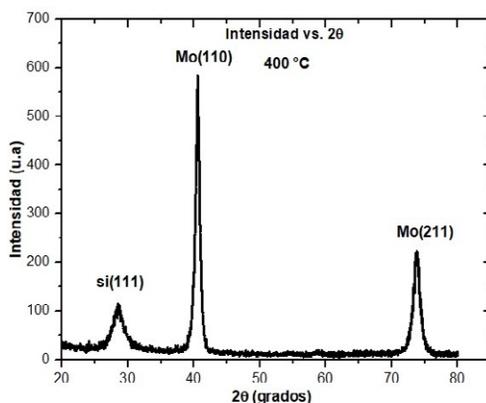
**Microscopía de fuerza atómica (AFM).** La morfología superficial de las muestras fue realizado mediante un microscopio de fuerza atómica modelo Dimensión Edge AFM-Bruker, con un cantiléver modelo RTESP de material antimonio (n) dopado con Si, de constante elástica  $k=40$  N/m y frecuencia de 300 kHz; con un radio de curvatura de la punta de 8nm, con una frecuencia de barrido de 10000 Hz.

**Microscopía electrónica de barrido (SEM).** En un microscopio electrónico de barrido, una pequeña sonda de electrones de 1 a 10 nm de diámetro escanea en una trama a través de la superficie de la muestra. Los electrones incidentes son dispersados elástica e inelásticamente por el espécimen. La dispersión elástica da como resultado grandes ángulos de dispersión y trayectorias electrónicas en zigzag. Por lo tanto, una fracción de electrones puede dejar la muestra como electrones retro dispersados. La imagen está formada por la señal de los electrones secundarios emitidos, los electrones retro dispersados, los electrones Auger, los cuantos de rayos X, que modulan la intensidad de un tubo de rayos catódicos rastreados en forma sincronizada<sup>12</sup>. Se utilizó dicha técnica para medir el espesor de las películas delgadas de nitruro de molibdeno. El instrumento usado fue HITACHI 8230.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estructura y composición

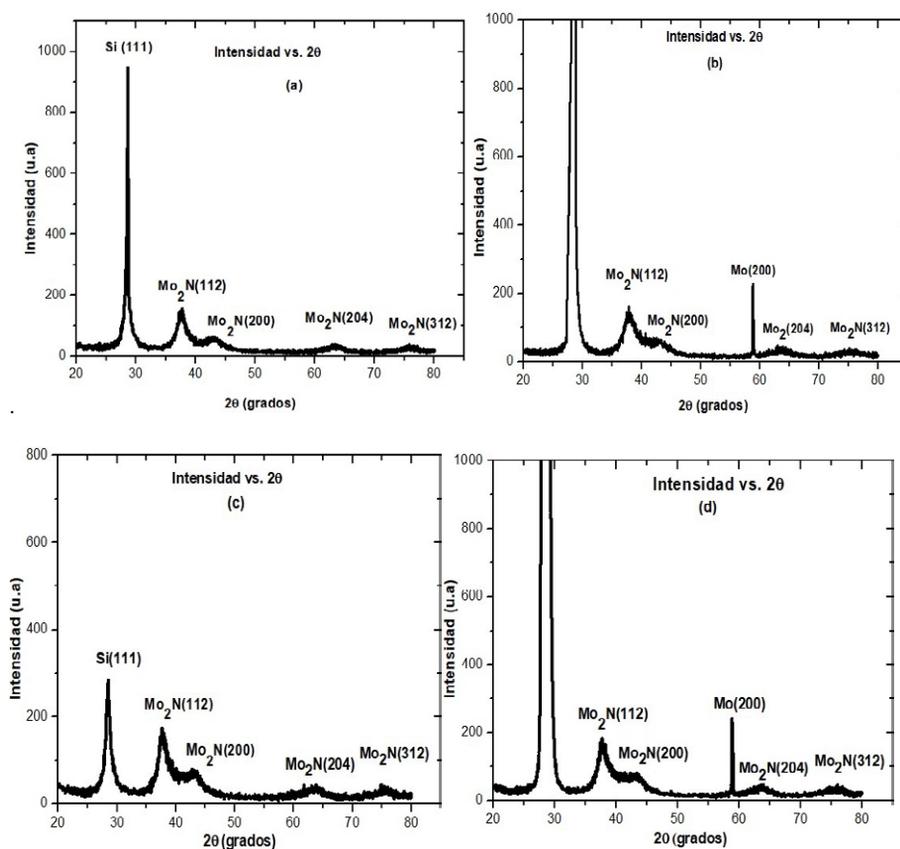
La figura 3 muestra el patrón de DRX de la película delgada de Mo depositada sobre sustrato de Si (111) preparada a la temperatura de sustrato de 400 °C mediante pulverización magnética reactiva DC. Un fuerte pico característico de DRX de Mo a  $2\theta=40,58^\circ$  es observado correspondiente a la dirección cristalográfica (110), la intensidad del pico de DRX indica que la película crece con una orientación preferencial a lo largo del plano (110); asimismo, el espectro también exhibe otro pico de Mo metálico Mo (211) a  $2\theta \approx 73,7^\circ$  de menor intensidad. Chen *et al.*<sup>7</sup> reportan picos de difracción similares de películas delgadas de Mo preparadas mediante pulverización catódica dc a diferentes presiones de trabajo. El tercer pico se observa a  $2\theta \approx 28^\circ$  el cual corresponde al sustrato de silicio (111). Los datos de DRX coincidieron bien con los archivos JCPDS. El tamaño de cristalito resultó ser de 10,06 nm calculado del ancho a la altura media del máximo pico (110) usando la ecuación de Scherrer; Kashyout *et al.*<sup>13</sup> han obtenido un valor de alrededor de 11 nm para el tamaño de grano de películas delgadas de Mo crecidas mediante pulverización catódica magnetrón dc a la temperatura de 450 °C. El parámetro de red ha sido calculado en 0,3166 nm.



**Figura 3.** Patrón de DRX de la película delgada de Mo sobre silicio (111) a 400 °C.

La figura 4(a-d) muestra los difractogramas de las películas delgadas de nitruro de molibdeno obtenidas en el rango de 100 a 400 °C, la intensidad de los picos decrecen, y un pico aparece a  $2\theta=37,72^\circ$  que es observado en todos los difractogramas, atribuidos a la orientación cristalográfica  $Mo_2N(112)$ , con referencia al International Centre for Diffraction Data 2018, sistema: tetragonal, y grupo espacial:  $I41/amd$  (141); Shen *et al.*<sup>14</sup> reportan similares picos de difracción para películas delgadas de nitruro de molibdeno preparadas por descarga de arco dc a diferentes presiones de nitrógeno. Picos de menor intensidad ocurren a  $2\theta\approx 43,20^\circ$  atribuido a la orientación cristalográfica  $Mo_2N(200)$ , también a  $2\theta\approx 64,19^\circ$  con la orientación cristalográfica  $Mo_2N(204)$  y el otro pico también de menor intensidad ocurre a  $2\theta\approx 75,59^\circ$  atribuido al  $Mo_2N(312)$ ; sistema: tetragonal, y grupo espacial:  $I41/amd$  (141), con referencia

al International Centre for Diffraction Data 2018. Picos de difracción ocurren a  $2\theta \approx 28^\circ$  en el rango de temperatura indicado correspondiente al sustrato de Si (111). A la temperatura de  $200^\circ\text{C}$  y  $400^\circ\text{C}$  un pico a aproximadamente  $59^\circ$  aparece en el espectro, indicando la presencia de partículas de Mo puro<sup>15</sup>, debido probablemente a un aumento en la energía cinética de las partículas de Ar en el plasma. El crecimiento de los cristalitas de las películas delgadas en el intervalo de  $100$  a  $400^\circ\text{C}$  de  $\text{Mo}_2\text{N}$  (112), es preferentemente a lo largo del plano (112). El tamaño medio de grano se ha estimado a partir del ancho completo a la mitad del máximo del pico de difracción<sup>13</sup> y utilizando la ecuación (1). El tamaño de grano indica un ligero incremento entre  $8,21$  y  $13,16$  nm. calculado del ancho completo a la mitad del máximo del pico (112) en el rango de  $100$  a  $400^\circ\text{C}$ . La película delgada de nitruro de molibdeno  $\text{Mo}_2\text{N}$  presenta una estructura tetragonal con parámetro de red:  $a=b=0,4188$  nm;  $c=0,8048$  nm.



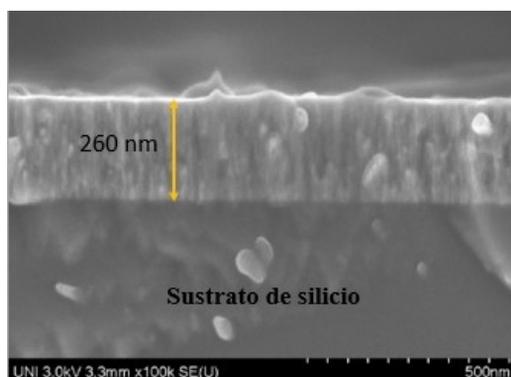
**Figura 3.** DRX de películas delgadas de  $\text{Mo}_2\text{N}$  sobre silicio (111) a diferentes temperaturas de sustrato, (a)  $100^\circ\text{C}$ , (b)  $200^\circ\text{C}$ , (c)  $300^\circ\text{C}$  y (d)  $400^\circ\text{C}$ .

En la tabla 1 se resume el análisis estructural de la película delgada de molibdeno y nitruro de molibdeno en función de la temperatura de sustrato.

**Tabla 1.** Resumen del análisis estructural de la película delgada de Mo y Mo<sub>2</sub>N como función de la temperatura de sustrato.

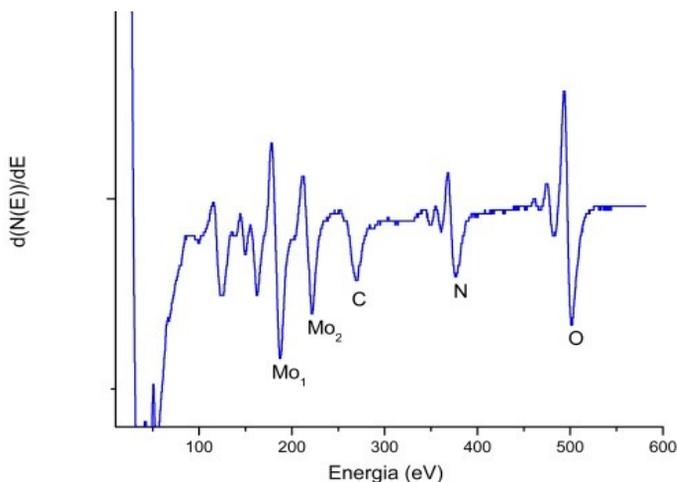
Muestra	2-Theta	Refl. (hkl)	FWHM / rad	Tamaño de grano
	(± 0,02) /grados			(± 1,18) / nm
Mo 400 °C	40,58	(110)	0,015	10,06
	73,70	(211)		
Mo <sub>2</sub> N 100 °C	37,72	(112)	0,018	8,21
	43,20	(200)		
	64,19	(204)		
	75,59	(312)		
Mo <sub>2</sub> N 200 °C	37,72	(112)	0,017	8,80
	43,20	(200)		
	64,19	(204)		
	75,59	(312)		
Mo <sub>2</sub> N 300 °C	37,72	(112)	0,946	10,08
	43,20	(200)		
	64,19	(204)		
	75,59	(312)		
Mo <sub>2</sub> N 400 °C	37,72	(112)	0,010	13,16
	43,20	(200)		
	64,19	(204)		
	75,59	(312)		

Imagen SEM de sección transversal de una película delgada de Mo<sub>2</sub>N depositada a 100 °C es ilustrada en la figura 5. Una densa microestructura con granos columnares de pequeño tamaño desde el sustrato hasta la parte superior de la película es observada, el espesor fue de 260 nm.



**Figura 5.** Micrografía SEM mostrando la sección transversal de una película delgada de nitruro de molibdeno depositado a 100 °C sobre un sustrato de silicio.

El análisis de espectroscopia electrónica Auger de la muestra de  $Mo_2N$  a 400 °C indica la presencia de  $Mo_1$  y  $Mo_2$  en los picos con energía de 186 eV y 220 eV; así también se observa la presencia de oxígeno, nitrógeno y carbono como se muestra en la figura 6. En la tabla 2 se muestra los resultados de los cálculos.



**Figura 6.** Espectro AES diferencial de una muestra de  $Mo_2N$  a 400°C versus energía cinética, donde  $\frac{dN(E)}{dE}$  revela la oscilación de plasmones.

**Tabla 2.** Picos Auger y concentraciones de una muestra de nitruro de molibdeno a 400 °C.

Elemento químico	Pico Auger /eV	Concentración / (%)
Mo	186	65
N	377	35

### Propiedades eléctricas

Los valores de la resistividad eléctrica de las películas delgadas de  $Mo_2N$  se determinaron con la técnica de la probeta de cuatro puntas<sup>16</sup>, los cuales son listadas en la tabla 3. El menor valor de la resistividad fue de  $2,45 \mu\Omega.cm$  (la corriente aplicada fue entre 5 a 100 mA) a la temperatura de deposición de 400 °C.

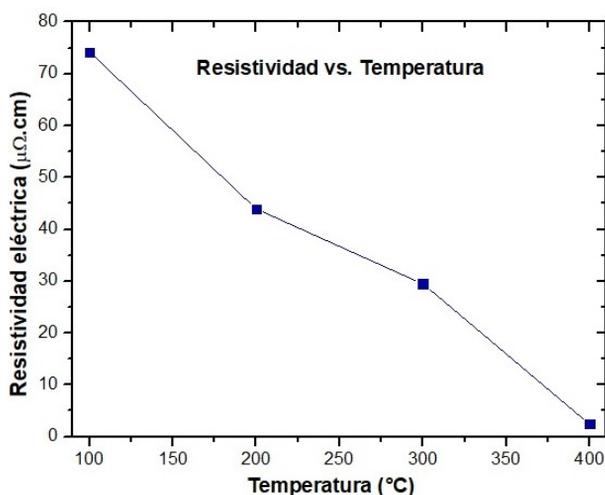
Un flujo de corriente  $I$  es aplicada entre las probetas externas, y un voltaje  $V$  es medido entre las dos probetas internas<sup>17</sup>. La corriente eléctrica fue suministrada de una fuente de corriente Modelo Keithley 6221, se aplicaron corrientes a cada una de las muestras en el intervalo de 5 a 100 mA, y la lectura de los correspondientes potenciales eléctricos se realizó con un nanovoltímetro Modelo Keithley 2182 A. Con los datos de corriente y voltaje registrados se obtuvo el valor de la resistencia eléctrica ( $V/I$ ) para las muestras de  $Mo_2N$  preparadas a 100, 200, 300 y 400 °C, respectivamente.

La medida del espesor de las muestras se realizó mediante microscopía electrónica de barrido, cuyos valores se presentan en la tabla 3. Entonces, utilizando la ecuación (2) se calculó la resistividad eléctrica de las muestras para cada temperatura de sustrato. La resistividad se midió a temperatura ambiente de las muestras obtenidas a diferentes temperaturas de sustrato y los resultados de los cálculos son listados en la tabla 3.

**Tabla 3.** Valores de la resistividad eléctrica de películas delgadas de nitruro de molibdeno a diferentes temperaturas de sustrato.

Temperatura / °C	Resistencia / $\Omega$	Espesor ( $\pm 2$ ) / nm	Resistividad / $\mu\Omega.cm$
100	0,63 $\pm$ 0,08	260	74,20 $\pm$ 9,93
200	0,34 $\pm$ 0,03	288	43,94 $\pm$ 4,23
300	0,26 $\pm$ 0,02	250	29,45 $\pm$ 2,27
400	0,033 $\pm$ 0,001	165	2,45 $\pm$ 0,01

La resistividad de todas la películas delgadas de  $Mo_2N$  se encuentran en el rango de 74 a 2  $\mu\Omega.cm$ , los cuales son mucho menores a los valores reportados de 900 a 500  $\mu\Omega.cm$  de películas delgadas de nitruro de molibdeno crecidas por pulverización catódica magnética reactiva r.f.<sup>8</sup>. La figura 7 muestra la variación de la resistividad eléctrica de las películas con la temperatura de sustrato.



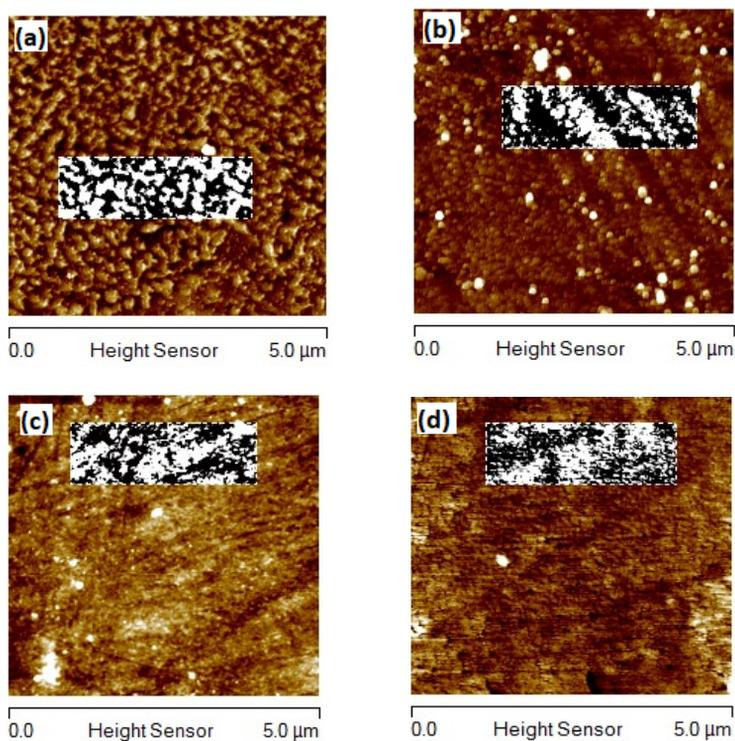
**Figura 7.** Resistividad eléctrica dependiente de la temperatura de sustrato, medida a temperatura ambiente.

La muestra preparada a la temperatura de 400 °C tiene un tamaño de grano mayor que la preparada a 100 °C. Este incremento en el tamaño de grano puede ser considerado ser la razón de la disminución en la resistividad de las películas delgadas de  $Mo_2N$  con el incremento de la temperatura de sustrato<sup>19</sup>. El aumento de temperatura produce incremento de la concentración de portadores, lo cual incrementa la movilidad de los portadores de carga de las películas de

$Mo_2N$  induciendo una gran disminución de la altura de la barrera de potencial de los límites de grano, así como el número de límites de grano. Con el incremento de la temperatura los límites de grano crecen para disminuir la energía de límite de grano, se disminuye las fuerzas cohesivas dentro y a través de los límites. Esto explica los resultados que la muestra preparada con temperatura de sustrato a 400 °C tiene el menor valor de resistividad eléctrica.

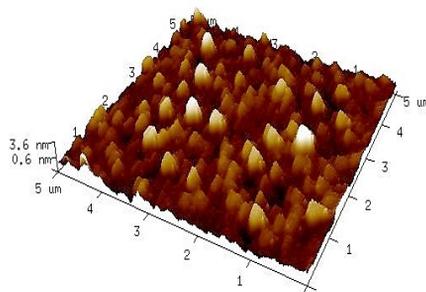
### Rugosidad

La figura 8 presenta micrografías AFM bidimensional (2D) de superficies de  $Mo_2N$  para varias temperaturas de sustrato, con un área barrida de  $5\mu m \times 5\mu m$ . Se observa una morfología granular en las imágenes AFM. La muestra depositada a 100 °C exhibe morfología totalmente diferente: una forma ondulada puede ser observada, y la superficie se ha vuelto bastante rugosa debido a la formación de una estructura irregular. Para 200 °C se observa una disminución de la rugosidad de la superficie de la película. Luego a 300 °C, la superficie es cubierta con suaves capas de nitruro de molibdeno. Sin embargo cuando la temperatura se incrementa a 400 °C, la rugosidad de la superficie se vuelve ligeramente áspera.



**Figura 8.** Imágenes AFM 2D de películas delgadas de  $Mo_2N/Si$ . (a) 100 °C, (b) 200 °C, (c) 300 °C, (d) 400 °C.

En la figura 9 se presenta una imagen topográfica AFM 3D tomada de un área de  $5 \times 5 \mu\text{m}$  de la película de  $\text{Mo}_2\text{N}$  a  $400 \text{ }^\circ\text{C}$ , mostrando una estructura superficial característica que consiste de partículas de tamaño nanométrico y con una rugosidad de  $0,776 \text{ nm}$ . La muestra fue preparada a la presión de  $4,3 \times 10^{-3}$  torr.



**Figura 9.** Imagen AFM 3D de la película delgada de nitruro de molibdeno depositada sobre silicio (111) a  $400 \text{ }^\circ\text{C}$ .

También medimos la rugosidad promedio (Ra) y la rugosidad raíz media cuadrática (rms) de todas las muestras, usando el perfilador tridimensional, cuyos resultados se resumen en la tabla 4. En la figura 10 se muestra la variación de la rugosidad versus la temperatura de síntesis de las muestras de  $\text{Mo}_2\text{N}$ .

**Tabla 4.** Valores de rugosidad promedio Ra y rugosidad eficaz Rq como función de la temperatura de sustrato.

Temperatura / $^\circ\text{C}$	Ra / nm	Rq / nm
100	1,093	1,343
200	0,909	1,423
300	0,457	0,618
400	0,776	0,987

La rugosidad promedio de la superficie depositada a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  resultó ser de  $1,093 \text{ nm}$ . Pero es reducida a  $0,457 \text{ nm}$  cuando la temperatura de deposición se incrementa a  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ . Esta reducción en la rugosidad de la superficie puede estar relacionado con la reacción de los átomos de la superficie del molibdeno con los átomos de nitrógeno<sup>2</sup>.

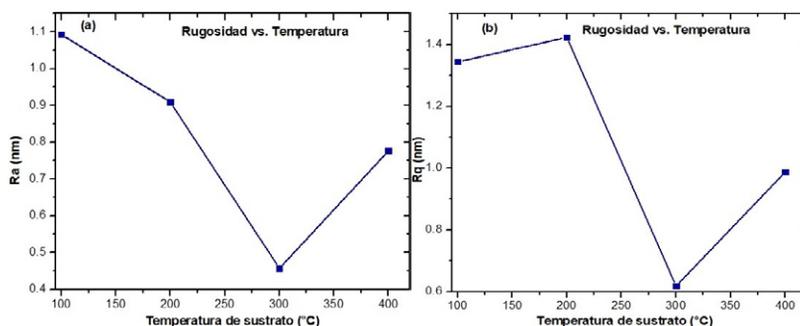


Figura 10. Rugosidad en función de la temperatura de sustrato. (a) Promedio, (b) rms.

La suavidad de la superficie es también particularmente atribuida al incremento de la velocidad de deposición, junto con la difusión y redeposición de átomos/iones de Mo después de la formación del nitruro; además, junto a la nitruración, puede mejorar la temperatura de la superficie localmente, lo que a su vez mejora la movilidad de los átomos de Mo en la superficie de la película en crecimiento, lo que también resulta en una película más suave<sup>20</sup>.

Luego, cuando se continúa aumentando la temperatura de síntesis a 400 °C, la superficie rugosa se incrementa ligeramente a 776 nm. Este aumento en la rugosidad puede atribuirse al incremento de la difusión superficial (movilidad) lo cual produce valles más grandes y más profundos<sup>2</sup>.

## CONCLUSIONES

Se sintetizó satisfactoriamente las películas delgadas de nitruro de molibdeno sobre silicio (111) mediante pulverización catódica magnética reactiva dc en el rango de 100 a 400 °C. El análisis de difracción de rayos X de las películas delgadas de Mo<sub>2</sub>N, indican que la temperatura de sustrato en el rango de 100 a 400 °C no influye significativamente en la estructura de tales películas. El tamaño de grano de las muestras se incrementa ligeramente con el aumento de la temperatura de sustrato, probablemente a la escasa difusión atómica a través del límite de grano. La resistividad de las películas de Mo<sub>2</sub>N disminuye con el incremento de la temperatura de síntesis, mostrando características óhmicas. Debido a la baja resistividad eléctrica y disminución de la rugosidad; estas películas pueden ser adecuadamente usadas como contacto óhmico posterior en células solares.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la empresa PLANSEE SE, Reutte, Austria. Al Dr. Wilder Aguilar por la obtención de las imágenes AFM en el laboratorio de física de la Universidad Nacional de Trujillo. Los autores también agradecen a: José L. Ampuero por su apoyo en el análisis de las muestras por la técnica de espectroscopia electrónica Auger y a Junior D. Asencios por su apoyo en el laboratorio de sputtering de la Universidad Nacional de Ingeniería. A Fernando Hurtado por su apoyo en las mediciones eléctricas en el laboratorio de nanotecnología de la Universidad Nacional de Trujillo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jauberteau I, Bessaudou A, Mayet R, Cornette J, Jauberteau JL, Carles P. Molybdenum Nitride Films: Crystal Structures, Synthesis, Mechanical, Electrical and Some Other Properties. *Coat.* 2015; 5(4): 656-687.
2. Khojier K, Mehr MRK, Savaloni H. Annealing temperature effect on the mechanical and tribological properties of molybdenum nitride thin films. *J Nanostruct Chem.* 2013; 3(1): 5. doi: 10.1186/2193-8865-3-5.
3. Sze P, Huang J, Chou D, Wang Y. Study of diffusion barriers for Au metal on liquid phase oxidized GaAs. *J Vac Sci Technol B.* 2006; 24(6): 2640-2644.
4. Thakur MK, Singh OP, Thakur K, Parmar R, Singh Gour K, Muhunthan N, et al. Effect of substrate on the structural and electrical properties of Mo thin films. *Adv Mater Lett.* 2016; 7(7): 525-528.
5. Guntur V. Molybdenum Nitride Films in the Back Contact Structure of Flexible Substrate CdTe Solar Cells. [Tesis para maestría]. Tampa, Florida: University of South Florida; 2011.
6. Senchenko E, Atuchin V, Khasanov T, Kochubey V, Pokrovsky L. Measurements of Optical Parameters of  $\gamma$ -Mo<sub>2</sub>N/Si (100) Thin Films. En: MEASUREMENT 2011, Proceedings of the 8th International Conference, Smolenice, Slovakia. 2011. p: 257-260.
7. Chen SF, Wang SJ, Lee WD, Chen MH, Wei ChN, Bor HY. Preparation and Characterization of Molybdenum Thin Films by Direct-Current Magnetron Sputtering. *Atlas J Mater Sci.* 2015; 2 (1): 54–59.
8. Miccoli I, Edler F, Pfnür H, Tegenkamp C. The 100th anniversary of the four-point probe technique: the role of probe geometries in isotropic and anisotropic systems. *J Phys Condens Matter.* 2015; 27(22):223201. doi: 10.1088/0953-8984/27/22/223201.
9. Hassan M, Qayyum A, Ahmad S, Naseer S, Khattak N, Zakaullah M. Structural and Mechanical Properties of Radiofrequency Ar-N<sub>2</sub> Plasma Nitrided Aluminium. *Mater Res.* 2015; 18(2): 353-359.
10. Li M, Yang M, Vargas E, Neft K, Vanli A, Liang R. Analysis of variance on thickness and electrical conductivity measurements of carbon nanotube thin films. *Meas Sci Technol.* 2016; 27: 095004. doi: 10.1088/0957-0233/27/9/095004.
11. Vickerman J, Gilmore I. *Surface Analysis.* 2<sup>nd</sup> edition. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2009.

12. Günzler H, Williams A. Handbook of Analytical Techniques. 1<sup>st</sup> edition. Weinheim, Germany: Wiley-vch; 2001.
13. Kashyout AE-HB, Soliman HMA, Gabal HA, Ibrahim PA, Fathy M. Preparation and characterization of DC sputtered molybdenum thin films. Alexandria Eng J. 2011;50(1):57-63.
14. Shen L, Wang N. Effect of Nitrogen Pressure on the Structure of Cr-N, Ta-N, Mo-N, and W-N Nanocrystals Synthesized by Arc Discharge. J Nanomater. 2011; 2011:781935. doi: 10.1155/2011/781935.
15. Shen L, Cui Q, Zhang J, Li X, Zhou Q, Zou G. A New Method for Preparation of Nanocrystalline Molybdenum Nitride. Chin Phys Lett. 2005; 22: 3192. doi: 10.1088/0256-307X/22/12/059.
16. Rodríguez C. Variación de la resistencia eléctrica como función de la temperatura de sistema película delgada de SnO<sub>2</sub>- superconductor cerámico. [Tesis pregrado]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2015.
17. Srinivasan NB. MOCVD of Metal nitride thin films: Deposition, film characteristics and functional properties. [Tesis doctoral]. Bochum: Ruhr Universität Bochum; 2014.
18. Anitha VP, Major S, Chandrashekharam D, Bhatnagar M. Deposition of molybdenum nitride thin films by r.f. reactive magnetron sputtering. Surf Coat Technol. 1996; 79: 50-54.
19. Ahn H, Lee D, Um Y. Substrate Temperature Effects on DC Sputtered Mo thin film. 2017; Appl Sci Converg Technol. 26(1): 11-15.
20. Ikhlaq U, Ahmad R, Shafiq M, Saleem S, Shah MS, Hussain T, et al. Nitriding molybdenum: Effects of duration and fill gas pressure when using 100-Hz pulse DC discharge technique. Chin Phys B. 2014; 23(10): 105203. doi: 10.1088/1674-1056/23/10/105203.

## ESTUDIO PRELIMINAR DE LA COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* CULTIVADO EN PULPA DE CAFÉ

Jessica I. Nieto-Juárez<sup>a</sup>, Ángel D. Cuzcano-Ruiz<sup>a</sup>, Walter A. Reyes-López<sup>a</sup>

### RESUMEN

Este trabajo de investigación tiene como finalidad obtener un alimento proteico y nutritivo mediante el cultivo de setas a partir de los residuos agrícolas e industriales, siendo la pulpa de café un residuo potencial para este propósito, con el fin de mejorar la salud pública y ambiental, reduciendo así la contaminación que estos residuos sólidos generan.

La composición nutricional de la seta *Pleurotus ostreatus* cultivado en pulpa de café fue estudiado, como un control de calidad para su consumo. La seta fue obtenida mediante la biotransformación del residuo sólido lignocelulósico (pulpa de café), fermentación en estado sólido. La pulpa de café fue suministrada por los cafetaleros del departamento de Amazonas (selva peruana) y Piura (sierra peruana).

Los resultados mostraron que el contenido de macronutrientes y micronutrientes en la seta *Pleurotus ostreatus* cultivado en pulpa de café procedente de los departamentos de Amazonas y Piura fueron similares. El contenido de proteína cruda, en muestra seca, fue de 28,6 % y 29,7 %, respectivamente, con un alto contenido de agua (~ 86 %) y un bajo contenido en carbohidratos (< 8 %) y grasas (< 1 %) en muestra fresca. El contenido de micronutrientes fue mayoritariamente de potasio, seguido de calcio, magnesio, sodio y trazas de hierro. La cantidad de cafeína en la seta fue menor a 10 µg/g en muestra seca.

Por consiguiente, esto indica que el alimento (seta de ostra) obtenido a partir del residuo pulpa de café es altamente proteico y saludable, el cual podría ser incluido en la dieta diaria para mejorar la salud de las personas, nutrición y controlar enfermedades.

**Palabras clave:** *Pleurotus ostreatus*, pulpa de café, macronutrientes, micronutrientes, cafeína.

---

<sup>a</sup> Grupo de Investigación en Calidad Ambiental y Bioprocesos (GICAB), Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru N° 210, Lima 25, Perú, jnieto@uni.edu.pe

## PRELIMINARY STUDY OF THE NUTRITIONAL COMPOSITION OF THE EDIBLE MUSHROOM *Pleurotus ostreatus* GROWN IN COFFEE PULP

### ABSTRACT

This research work aims to obtain a nutritious and protein food by growing of edible mushrooms from agricultural and industrial waste, being the coffee pulp a potential waste for this purpose, in order to improve public and environmental health, thus reducing the pollution that these solid waste generate.

The nutritional composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* grown in coffee pulp was studied as a quality control for its human consumption. The edible mushroom was obtained by the biotransformation of the lignocellulosic solid waste (coffee pulp), i.e. solid-state fermentation. The waste of coffee pulp was supplied by coffee farmers from the Department of Amazonas (Peruvian Rainforest) and Piura (Peruvian Highlands).

The results showed that the content of macro and micronutrients in the oyster mushroom grown in coffee pulp from the department of Amazonas and Piura were similar. The content of crude protein, in dry sample, was of 28,6 % and 29,7 % respectively, with a high-water content (~ 86 %) and a low content of carbohydrates (< 8%) and fats (< 1%), in fresh sample. The micronutrient content was mostly potassium, followed by calcium, magnesium, sodium and traces of iron. The content of caffeine in the oyster mushroom was less than 10 µg/g in dry sample.

Therefore, this indicates that the oyster mushroom grown on coffee pulp waste is highly nutritious and healthy, which could be included in the daily diet to improve people's health, nutrition and control diseases.

**Key words:** *Pleurotus ostreatus*, coffee pulp, macronutrients, micronutrients, caffeine.

### INTRODUCCIÓN

La biotransformación de los residuos agrícolas o agroindustriales mediante el cultivo de hongos es considerada como un método de tratamiento ecológico y de valorización debido al aprovechamiento de estos residuos para transformarlos a un alimento nutritivo (setas) que podría servir para la comercialización, y, a su vez, en la reducción del impacto ambiental que estos residuos sólidos generan.

Los hongos comestibles (setas), como *Pleurotus* spp., *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Auricularia* spp., *Flammulina velutipes*, entre otros, son considerados alimentos funcionales de alto valor nutricional y medicinal<sup>1-3</sup>. Su composición nutricional depende de la especie del hongo, del tipo de residuo sólido lignocelulósico y del método de cultivo<sup>4</sup>. Siendo los hongos comestibles *Pleurotus* spp., particularmente *Pleurotus ostreatus*, el más estudiado

y producido a nivel mundial debido, principalmente, a que crece en una gran variedad de residuos lignocelulósicos y a su fácil manejo en la producción. Su composición nutricional, en macronutrientes, presenta un significativo contenido, en materia seca, de proteínas (17-42 %) con buena distribución de aminoácidos esenciales y no esenciales, bajo contenido de carbohidratos (37-48 %), grasas (0,5-5 %), y, considerable contenido de fibra (24-31 %) y vitaminas<sup>5</sup>. La composición, en micronutrientes (minerales), encontrados en el cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus ostreatus*, comúnmente llamado seta de ostra, son el potasio como elemento mayoritario, seguido por el fósforo, magnesio, sodio, calcio, hierro, zinc, manganeso y cobre<sup>5, 6</sup>.

Los sustratos lignocelulósicos, basados en residuos de café, utilizados en el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* están siendo estudiados ampliamente, debido a que se generan residuos sólidos de gran volumen e importancia ambiental<sup>7-9</sup>. La industria cafetalera desecha el 90,5 % como pulpa (vía húmeda), cáscara (vía seca), mucílago y pergamino<sup>10</sup>, siendo los más investigados la pulpa de café.

En el Perú es escasa la producción de setas de ostra (*Pleurotus ostreatus*), y se suma el desconocimiento de los aportes nutricionales de la seta cultivado en estos residuos, debido principalmente a la poca información científica o cultural que se tiene, que, por consiguiente, limita su consumo culinario y producción. A pesar de que hay evidencias que nuestras culturas pre-Inca tenían conocimiento sobre los hongos, y, sobre sus usos y beneficios, como puede verse en los mantos y huacos<sup>11</sup>. Adicionalmente, las propiedades nutricionales de las setas dependen del tipo de especie de hongo, del residuo sólido lignocelulósico y de las condiciones de cultivo. Por lo que, investigaciones para determinar la composición nutricional de setas cultivadas en residuos sólidos lignocelulósicos deben ser direccionadas, para luego, recién ser incorporadas en la dieta diaria para consumo y, finalmente, su comercialización.

El objetivo de esta investigación es evaluar la composición nutricional del hongo *Pleurotus ostreatus* cultivado en pulpa de café de dos zonas productoras de café del Perú (departamentos de Amazonas y Piura), como un control de calidad para su consumo, y, a su vez, para que sea utilizado como una alternativa de tratamiento para la reducción de la contaminación ambiental y el aprovechamiento de estos residuos. La semilla micelial del hongo se preparó a partir de un basidiocarpo comercial en el laboratorio. La composición nutricional de la seta de ostra se determinó mediante el análisis de macronutrientes y micronutrientes (minerales), y la presencia de cafeína fue también evaluada.

Además, cabe resaltar que esta investigación no solo tiene implicancias de mejorar la salud, sino también de reducir la contaminación ambiental que estos residuos generan mediante un tratamiento ecológico y sostenible que es el cultivo de hongos a partir de estos residuos.

## PARTE EXPERIMENTAL

La pulpa de café (*Coffea arabica*) fue suministrada por los cafetaleros de la provincia de Huancabamba en el departamento de Piura (sierra peruana) y por la provincia de Rodríguez de Mendoza en el departamento de Amazonas (selva peruana), quienes cultivan café orgánico, el cual fue usado como sustrato en el cultivo de las setas de ostra (*Pleurotus ostreatus*) mediante proceso de fermentación en estado sólido.

### Preparación de la semilla micelial o spwan (inóculo)

La cepa original del hongo *Pleurotus ostreatus* se obtuvo a partir de un basidiocarpo comercial, el cual fue cultivado en medio PDA (agar papa dextrosa) en placas petri en condiciones de asepsia e incubado a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C<sup>8</sup>. Una vez que la expansión másica del micelio ha invadido toda la placa petri, se procedió a fraccionar el micelio, para ser usado en la elaboración de la semilla micelial.

La preparación de la semilla micelial *Pleurotus ostreatus* se realizó en granos de trigo, como un sustrato intermedio, para ser usado como inóculo en el sustrato definitivo, pulpa de café. Esto consistió en usar una fracción del micelio de la placa petri y añadirlo al sustrato intermedio, que ha sido precocido y esterilizado a temperatura de 121°C y presión de 15 psi por 20 minutos en bolsas de polipropileno. Estas bolsas con los granos de trigo y micelio se incubaron a  $25 \pm 2$  °C en oscuridad, y al cabo de dos semanas, los granos de trigo se encontraban invadidos por completo por el micelio, indicando que está listo para ser usado como inóculo en el residuo de pulpa de café.

### Acondicionamiento del sustrato

La preparación del sustrato consistió en pasteurizar e hidratar la pulpa de café. La pasteurización se realizó a una temperatura de  $85 \pm 5$  °C por dos horas, para eliminar los microorganismos que pueden ser competidores en la producción del hongo. La hidratación consistió en humedecer el residuo de café hasta una humedad de 70 %. Esto se logró al finalizar el proceso de pasteurización, se desechó el agua y se dejó secar a temperatura ambiente el sustrato hasta la humedad requerida, la cual se midió mediante la prueba del puño<sup>12</sup>.

### Producción del hongo

La producción del hongo en la pulpa de café se realizó en cuatro etapas: inoculación, incubación, fructificación y cosecha según Rodríguez y Jaramillo<sup>8</sup>, como puede verse en la figura 1. La inoculación consistió en mezclar la semilla micelial con el sustrato acondicionado a una proporción del 10 % (g semilla/100 g sustrato húmedo) en una bolsa de polipropileno, para 1 kg de sustrato. La incubación de las muestras inoculadas se realizó en una incubadora a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C y en oscuridad, la expansión másica del micelio en el sustrato acondicionado duró 20 días. Una vez terminada la incubación, se procedió a fructificar las muestras, que consistió en sacar las muestras de la incubadora y ponerlas en una vitrina condicionada con ligera luz (12 h diarias), ventilación ambiental y a una temperatura de  $18,9 \pm 1$  °C y humedad relativa de  $85 \pm 5$  % (meses de junio a setiembre en Lima), y se removió

la bolsa a las muestras para un mejor desarrollo de los primordios y crecimiento del cuerpo fructífero. Una vez que el cuerpo fructífero estaba maduro, se procedió a cosechar las setas entre 7 a 15 días. La eficiencia biológica (E.B., %) se define como la producción del cuerpo fructífero fresco entre el sustrato seco<sup>8</sup>.

#### **Análisis de macronutrientes (proximal)**

El análisis proximal fue realizado mediante métodos de ensayo de la FAO Food and Nutrition Paper 14/7<sup>13</sup>. Se determinó carbohidratos, grasas, proteínas, humedad, cenizas, energía calorífica en la seta de ostra (muestra fresca).

#### **Análisis de micronutrientes (minerales)**

El análisis cuantitativo de los microelementos en la seta de ostra (muestra seca), se determinó por un equipo de Absorción Atómica, contrAA 800 Analytik Jena en el Laboratorio 21 de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Ingeniería. Los microelementos que se determinaron fueron potasio, sodio, calcio, magnesio, cobre, hierro, zinc y manganeso en la seta de ostra (muestra seca).

#### **Análisis de cafeína**

El contenido de cafeína, en la seta de ostra (muestra seca), se determinó mediante Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento-HPLC Shimadzu, con detector de arreglo de diodos (DAD), a una longitud de onda de 272 nm, con fase móvil de agua:metanol (75:25), flujo de 1 ml/min y columna RP C18 Restek de 250 mm x 4,6 mm ID x 5 µm. El tratamiento de la muestra fue realizado mediante la norma técnica AOAC 960.2514 y la determinación de la cafeína por HPLC fue realizado según DIN 20481<sup>15</sup>.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* en el residuo pulpa de café duró de 27 a 35 días (figura 1). La eficiencia biológica (E.B.) del cultivo procedente de los departamentos de Amazonas y Piura fue de  $121,7 \pm 8,1$  % y  $90,2 \pm 10,0$  %, respectivamente. Estudios previos han reportado una E.B. de 159,9 % inoculado entre 0,5 y 3 % de spawn<sup>9</sup>, de 110-120 % no reporta la cantidad de semilla micelial utilizada<sup>16</sup> y de 90 % inoculado al 3 % de spawn<sup>8</sup>, evidenciando que nuestros resultados fueron similares en la producción del hongo *Pleurotus ostreatus* cultivado en pulpa de café, a pesar de que fue inoculado tres veces más. Esto debido, a ensayos previos que se realizaron sobre la E.B. en función de la cantidad de semilla micelial adicionado al sustrato acondicionado (pulpa de café), cuyos resultados mostraron que la óptima cantidad de semilla micelial estaba en 10 % bajo nuestras condiciones de cultivo, menor a esa cantidad el tiempo de cultivo era superior a 45 días y a mayor cantidad de semilla no aumentaba significativamente la producción (datos no mostrados).



Figura 1. Proceso de cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* en el residuo pulpa de café.

Los valores nutricionales del cuerpo fructífero (seta de ostra), obtenido en la bioconversión del residuo pulpa de café procedente de los departamentos de Amazonas (DA) y Piura (DP), reportaron contenidos de macronutrientes y micronutrientes similares. El contenido de proteína cruda fue de 28,6 % y 29,7 % para el residuo del DA y DP, en muestra seca, indicando la capacidad del hongo *Pleurotus ostreatus* de asimilar y bioconvertir los residuos lignocelulósicos y nitrogenados del sustrato<sup>4,17</sup>. La seta de ostra presentó un alto contenido de agua (~ 86 %), con un bajo contenido en carbohidratos (< 8 %) y grasas (< 1 %), en muestra fresca para ambas procedencias del residuo pulpa de café, como se muestra en la tabla 1. Esto indica que la seta de ostra es un alimento proteico con bajo contenido calórico (< 50 kcal/100g hongos frescos). Investigaciones previas han reportado que el contenido de proteína a partir de este residuo de café varió de 17 a 35 %<sup>8, 16, 18</sup>, indicando que la procedencia del sustrato (ubicación geográfica) y las condiciones de cultivo pueden influir en la bioconversión del residuo y, por ende, en la composición nutricional de macronutrientes.

Tabla 1. Análisis cuantitativo de macronutrientes de la seta *Pleurotus ostreatus* cultivado en pulpa de café de los departamentos de Piura y Amazonas (muestra fresca).

Muestra	Humedad (%)	Proteína (%)	Carbohidratos (%)	Grasas (%)	Ceniza (%)	Energía Total (kcal/100g)
Departamento de Piura						
Seta de ostra	88,11	3,53 29,69 <sup>a</sup>	7,37	0,03	0,96	43,87
Departamento de Amazonas						
Seta de ostra	87,36	3,61 28,56 <sup>a</sup>	7,92	0,09	1,02	46,93

<sup>a</sup> muestra en base seca

Con respecto al contenido de micronutrientes (minerales) en el cuerpo fructífero, se realizó previamente un análisis cualitativo, con el objeto de saber que microelementos contenía la seta para su posterior cuantificación, encontrándose la presencia de P, K (elementos mayores), Ca, Mg, Na (elementos menores) y trazas de Cu, Fe, Zn, Mn y Si (datos no mostrados). En base a esto, se procedió a realizar el análisis cuantitativo de los micronutrientes que son potenciales para la salud, siendo estos mayoritariamente de potasio (1400-1550 mg), seguido de calcio (450-550 mg), magnesio (425-450 mg), sodio (330-345 mg) y trazas de hierro (18-21 mg) en 100 g de muestra seca, para ambas procedencias del residuo pulpa de café, como se muestra en la tabla 2. Como puede observarse, la composición de minerales no presenta diferencias significativas por la procedencia del sustrato, pero sí una importante cantidad de estos para la salud. El contenido de Cu, Zn y Mn no fue detectado (L.D. < 1 ppm). Investigaciones previas han reportado que la seta *Pleurotus ostreatus*, cultivada en otros sustratos, contienen mg elemento/100 g muestra seca, como elemento mayoritario al potasio (1400-5000), seguido por el fósforo (600 -1400), magnesio (156-203), sodio (54-136), calcio (47), hierro (13), zinc (5), manganeso (1,3) y cobre (1,2)<sup>6, 8</sup>.

Estas propiedades nutricionales presentes en la seta de ostra, cultivada en residuo pulpa de café, la convierten en un alimento altamente nutritivo y proteico, el cual podría ser incorporado en la dieta diaria para su consumo, con el objetivo de mejorar la salud de las personas, la nutrición y controlar enfermedades como anemia, diabetes, colesterol, entre otras.

**Tabla 2.** Análisis cuantitativo de micronutrientes de la seta *Pleurotus ostreatus* cultivada en pulpa de café de los departamentos de Piura y Amazonas (muestra seca).

Muestra	Microelementos (mg/100 g MS)							
	K	Ca	Mg	Na	Fe	Cu	Zn	Mn
Departamento de Piura (sierra peruana)								
Seta de ostra	1537,9	451,5	449,5	332,0	18,4	N.D.	N.D.	N.D.
Departamento de Amazonas (selva peruana)								
Seta de ostra	1406,9	554,5	428,7	348,5	20,8	N.D.	N.D.	N.D.

MS = muestra seca      N.D. = no detectado (L.D. < 1 ppm)

Como se muestra en la tabla 3, el contenido de cafeína en la seta ostra fue muy bajo, menor a 10,0 µg/g muestra seca, comparado con otros estudios que reportan una concentración de cafeína entre 0,1 y 0,2 % en la seta ostra cultivada en residuos de pulpa y cáscara de café<sup>19,20</sup>. Además, los resultados muestran que la seta absorbe alrededor de un 50 % la cafeína presente en la pulpa de café y el resto se queda en el residuo (sustrato agotado + hongo), indicando que la seta no es capaz de degradar la cafeína, como otros autores lo reportan<sup>19,21</sup>.

**Tabla 3.** Contenido de cafeína en la seta *Pleurotus ostreatus* cultivada en pulpa de café de los departamentos de Piura y Amazonas (muestra seca).

Muestra	µg cafeína/ g muestra seca	
	Piura	Amazonas
Seta de ostra	4,347 ± 0,014	9,630 ± 0,920
Residuo (sustrato agotado + hongo)	4,748 ± 0,015	16,786 ± 0,042

### CONCLUSIONES

En este estudio preliminar se encontró que la seta de ostra, cultivada en residuo pulpa de café, es un alimento altamente nutritivo y saludable. No hubo diferencias considerables en la composición nutricional de macronutrientes (análisis proximal) y micronutrientes (minerales) del hongo *Pleurotus ostreatus* cultivado en pulpa de café procedente de los departamentos de Amazonas y de Piura. El residuo pulpa de café resultó ser un excelente sustrato para el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*.

### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Química y Textil (Proyecto de Investigación Formativa 2017, código: CPD11-2017-6) y al Vicerrectorado de Investigación (Proyecto de Investigación Formativa 2018, código: PIF-FIQT-F-3-2018) de la Universidad Nacional de Ingeniería por el financiamiento para realizar la investigación.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cheung P. Mushrooms as functional foods. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.; 2008.
2. Martínez-Carrera D, Sobal M, Morales P, Martínez W, Martínez M, Mayett Y. Los Hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales y su contribución a la alimentación mexicana. El *shiitake*. México: Editorial Colegio de Postgraduados (COLPOS); 2004.
3. Khan MA, Tania M. Nutritional and Medicinal Importance of *Pleurotus* Mushrooms: An Overview. *Food Rev Intern*. 2012; 28:313-329.
4. Barba M, Assumpção F, Aparecida H, Lopes G, Ávila S, Silveira P, y col. Review: Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi J Biol Sci*. 2019; 26:633-646.
5. Deepalakshmi K, Mirunalini S. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *J Biochem Tech*. 2014; 5(2):715-726.

6. Carrasco-González JA, Sema-Saldívar SO, Gutiérrez-Urbe JA. Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingredient. *J Food Compost Anal.* 2017; 58:69-81.
7. Fan L, Pandey A, Mohan R, Soccol CR. Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Acta Biotechnol.* 2000; 20:41-52.
8. Rodríguez N, Jaramillo C. Cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* sobre residuos agrícolas de la zona cafetalera, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, CENICAFE 2004.
9. Martínez-Carrera D, Aguilar A, Martínez W, Bonilla M, Morales P, Sobal M. Chap45: Commercial production and marketing of edible mushrooms cultivated on coffee pulp in Mexico. En: Sera T, Soccol C, Pandey A, Roussos S. Eds. *Coffee Biotechnology and Quality*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000, p. 471-488.
10. Mussatto SL, Machado EMS, Martins S, Teixeira JA. Production, Composition and Application of Coffee and its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technol.* 2011; 4:661-672.
11. Trutmann P. The forgotten mushrooms of ancient Peru. *Global Mountain Action, Fungi and Mountains Publication Series* 2012; 1:33.
12. Palmero R. Elaboración de compost con restos vegetales por el sistema tradicional en pilas o montones [Internet]. Cabildo Insular de Tenerife, España: Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural; 2010. [Consultado 4 Jun 2018]. Disponible en: <http://www.ecohabitar.org/wp-content/uploads/2013/10/elaboracion-de-compost-con-restos-vegetales-1.pdf>
13. FAO. *Manuals of food quality control. 7. Food analysis: general techniques, additives, contaminants and composition* [Internet]. Rome, Italy: FAO Food and Nutrition Paper 14/7; 1986 [Consultado 7 May 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/AM808E/AM808E.pdf>
14. Horwitz W, Latimer GW. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18<sup>th</sup> Ed; Gaithersburg, Md.: AOAC International; 2005.
15. Naegele E. Determination of caffeine in coffee products according to DIN 20481 [Internet]. Waldbronn, Germany: Agilent Technologies, Inc; 2016 [Consultado 7 May 2018]. Disponible en: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-2851EN.pdf>
16. Bermúdez RC, García CN, Serrano M, Rodríguez MI, Mustelier I. Conversión de residuos agroindustriales en productos de valor agregado por fermentación en estado sólido. *RTQ.* 2014; 34(3):263-274.
17. Bermúdez RC, Morris HJ, Donoso C, Martínez CE, Ramos EI. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. florida. *Rev Cuba Investig Bioméd.* 2003; 22(4):226-231.
18. Nieto IJ, Chegwin C. Influencia del sustrato utilizado para el crecimiento de hongos comestibles sobre sus características nutraceuticas. *Rev Col Biotecnol.* 2010; 2(1):169-178.

19. Fan L, Soccol AT, Pandey A, Porto de Souza L, Soccol CR. Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. *Brazilian J Microbiol.* 2006; 37:420-424.
20. Salmones D, Mata G, Waliszewski KN. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresour Technol.* 2005; 96:537-544.
21. Nieto Ramírez IJ, Chegwin Angarita C, Osorio Zuluaga HJ. Incorporación de cafeína en el hongo *Pleurotus sajor-caju* cultivado sobre pulpa de café. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 24:72-74.

## ESTUDIO TEÓRICO DEL PLASMÓN EN NANOESFERAS DE ORO

Ana María Osorio Anaya\*<sup>a</sup>, Joaquín J. Manrique Fajardo<sup>a</sup>, Óscar Cornejo Sánchez<sup>a</sup>

### RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la simulación del comportamiento plasmónico de nanoesferas de oro con diámetros de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 nm en medio acuoso frente a la luz en el rango de longitudes de onda de 400 a 650 nm. Se observó una mayor contribución de la dispersión al espectro de extinción en función del tamaño de nanoesferas, el cual presentó un comportamiento exponencial.

**Palabras clave:** nanoesferas de oro, plasmón, aproximación de dipolo discreto.

### THEORETICAL STUDY OF THE PLASMON IN GOLD NANOSPHERES

#### ABSTRACT

In the present work the simulation of the plasmonic behavior of gold nanospheres with diameters of 10, 20, 30, 40, 50 y 60 nm in aqueous medium against light with wavelengths ranging from 400 to 650 nm was done. A greater contribution of the scattering to the extinction spectrum was observed as a function of the size of the nanosphere, which exhibited an exponential behavior.

**Key words:** gold nanospheres, plasmon, discret dipole approximation.

#### INTRODUCCIÓN

En 1951, Turkevich y col.<sup>1</sup> realizaron el estudio de los procesos de nucleación y desarrollo del oro coloidal, encontrando diversos tamaños y formas del metal, en función a la temperatura, concentración del reductor, entre otros factores, hoy en día este excelente estudio sirvió y sirve de base a la química computacional para realizar estudios teóricos de las propiedades ópticas que presentan las nanopartículas de oro al interactuar con la luz, las cuales, en nivel experimental, presentan una variedad de colores debido al tamaño y forma.

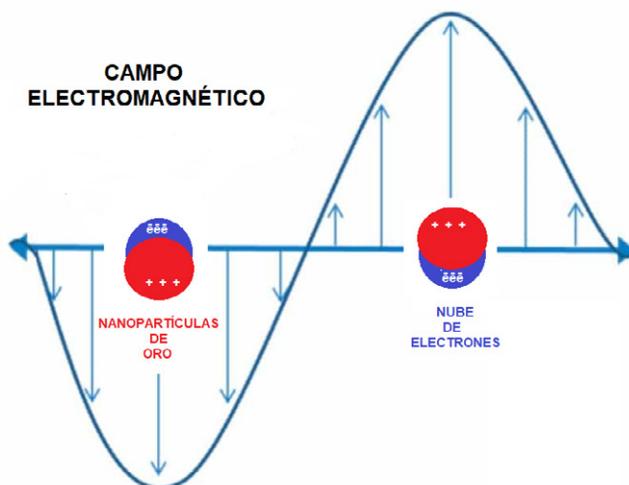
---

<sup>a</sup> Laboratorio de Nanotecnología e innovación tecnológica, Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Calle Germán Amézaga 375, Lima, Perú.

\* aosorio@unmsm.edu.pe

Nanopartículas de metales nobles como oro, platino y plata exhiben comportamiento de alta absorción y dispersión de luz, este es dependiente de su tamaño, forma y composición. Las nanopartículas de oro y plata muestran respuestas espectrales únicas debido a que en longitudes de ondas específicas llevan a los electrones libres o gas de electrones de las nanopartículas metálicas a oscilar colectivamente. De este comportamiento se genera la resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR), la cual está confinada a un volumen pequeño en la vecindad cercana de la nanopartícula aislada<sup>2</sup>.

Desde el punto de vista teórico, los fenómenos de interacción entre la radiación electromagnética y las nanopartículas metálicas generan un movimiento colectivo de los electrones de las nanopartículas dentro de un medio dieléctrico a una cierta frecuencia de resonancia, la LSPR genera dos efectos, la pérdida de calor debido a interacciones con la red de los átomos metálicos, originando la absorción de la luz y el desplazamiento de los electrones libres de carga negativa respecto al núcleo pesado del metal de carga positiva, generando un dipolo oscilante que emite radiación electromagnética a la misma frecuencia de la oscilación, según se observa en la figura 1, de tal forma que se genera fenómenos de dispersión de luz o scattering<sup>2,3</sup>.



**Figura 1.** Resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR). Adaptado de Willets (2007).

Debido a sus propiedades ópticas las nanopartículas de oro presentan aplicaciones diversas. En el caso de la dispersión de luz es empleada en mapeo de imágenes y seguimiento de procesos biológicos dinámicos en células vivas y el fenómeno de absorción empleado como terapia fototérmica<sup>4,5</sup>.

La aproximación de dipolo discreto (DDA) permite modelar las propiedades ópticas como dispersión y absorción de ondas electromagnéticas por partículas de geometría arbitraria y distintos índices de refracción, tanto como partículas aisladas como arreglos periódicos 1-d y 2-d mediante la representación de la partícula como un conjunto de puntos polarizables<sup>6</sup>.

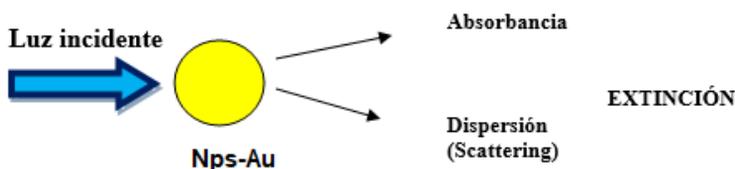
La dispersión del campo magnético es resuelta para un conjunto de dipolos ( $j=1, \dots, N$ ) con polarizabilidades  $\alpha_j$ , localizados en posiciones  $r_j$ . Cada dipolo tiene una polarización  $P_j = \alpha_j E_j$  donde  $E_j$  es el campo eléctrico en  $r_j$  es debido a la onda incidente  $E_{inc,j} = E_0 \exp(ik \cdot r_j - i\omega t)$  más la contribución de cada otro  $N - 1$  dipolos:

$$E_j = E_{inc,j} - \sum_{k \neq j} A_{jk} P_k$$

donde  $-A_{jk} P_k$  es el campo eléctrico en  $r_j$  debido al dipolo  $P_k$  en la posición  $r_k$ , incluyendo los efectos de retardación<sup>7</sup>.

La DDA se está aplicando para modelar no sólo las interacciones de la luz con nanopartículas esféricas de diversos tamaños, las que resultan con comportamientos isotrópicos frente a la luz, sino también a medida que se van conociendo nuevas vías de síntesis de nanopartículas metálicas para diversas aplicaciones, se proponen cálculos teóricos como para nanoelipsoides, nanocilindros y nanobarras, cuyas propiedades ópticas son anisotrópicas, para nanopartículas esféricas se muestra una sola banda de absorción y para partículas tipo nanorod se presentan dos bandas de absorción<sup>8,9</sup>.

Como se sabe, las nanopartículas al interactuar con la luz tienen la probabilidad de que un fotón incidente sea absorbido o dispersado, tal como se aprecia en la figura 2, este fenómeno óptico puede expresarse en forma cuantitativa a través de los valores de la sección eficaz de absorción ( $\sigma_{abs}$ ) y de dispersión o scattering ( $\sigma_{sca}$ ). Al aumentar la sección eficaz de absorción o de dispersión, aumenta la probabilidad de que sucedan estos fenómenos. La suma de los efectos de absorción y dispersión se denomina extinción ( $\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{sca}$ )<sup>3</sup>.



**Figura 2.** Extinción en función de la absorbancia y la dispersión.

## DETALLES DE LA SIMULACIÓN COMPUTACIONAL

La respuesta óptica de nanoesferas de oro de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 nm de diámetro fue calculada bajo el método de aproximación de dipolo discreto (DDA) empleando el código por Draine y Flatau<sup>10</sup> y haciendo uso de los algoritmos: gradiente conjugada con estabilización implementado en la subrutina ZBCG2 por Botchev<sup>11</sup> y GPFA FFT por Temperton<sup>12</sup>.

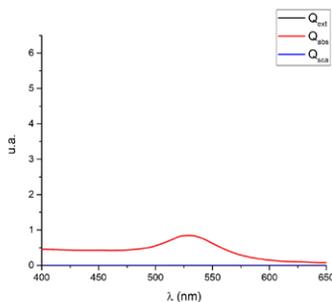
Se emplearon las constantes ópticas reportadas por Johnson y Christy<sup>12</sup>, el medio rodeando a la nanoesfera fue representado por agua con un índice de refracción de 1,33. El desarrollo computacional se llevó a cabo con luz incidente simulada en el rango de 400 a 650 nm.

Las simulaciones se realizaron en una computadora core i7 7700K a 4.30GHz con 16GB de RAM. Los cálculos tardaron alrededor de 10 horas.

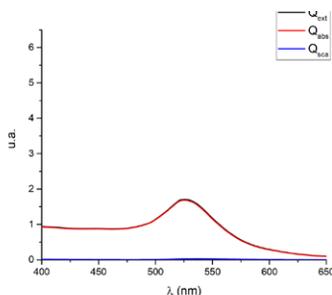
Se graficaron los datos de simulación para cada tamaño de nanoesfera de oro y se registran los datos en la tabla N° 1 y tanto ésta como los gráficos 9 y 10 se emplearán para la discusión.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

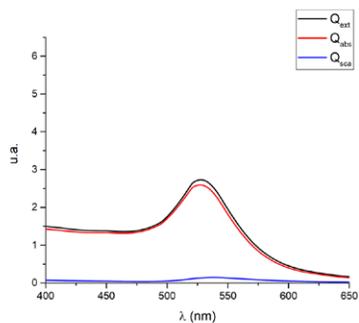
Los espectros de extinción ( $Q_{\text{ext}}$ ), absorción ( $Q_{\text{abs}}$ ) y dispersión ( $Q_{\text{sca}}$ ) para nanoesferas de oro de distintos tamaños: 10, 20, 30, 40, 50 y 60 nm en medio acuoso, como se muestran en las figuras 3-8 observándose la presencia de una única banda de plasmón.



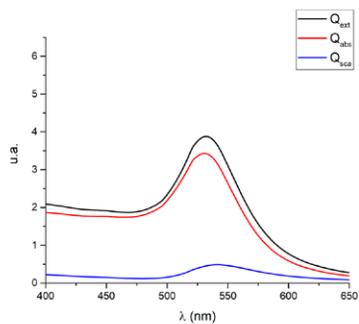
**Figura 3.** Espectro de extinción, absorción y dispersión nanoesfera de oro de 10nm.



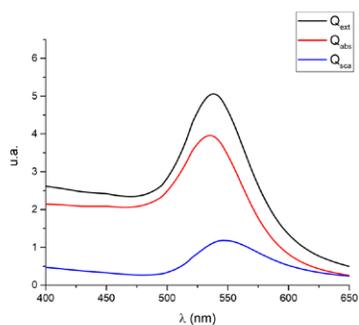
**Figura 4.** Espectro de extinción, absorción y dispersión nanoesfera de oro de 20nm.



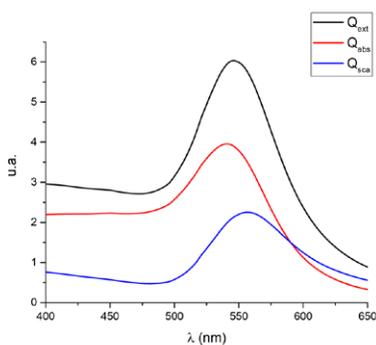
**Figura 5.** Espectro de extinción, absorción y dispersión nanoesfera de oro de 30nm.



**Figura 6.** Espectro de extinción, absorción y dispersión nanoesfera de oro de 40nm.



**Figura 7.** Espectro de extinción, absorción y dispersión nanoesfera de oro de 50nm.



**Figura 8.** Espectro de extinción, absorción y dispersión nanoesfera de oro de 60nm.

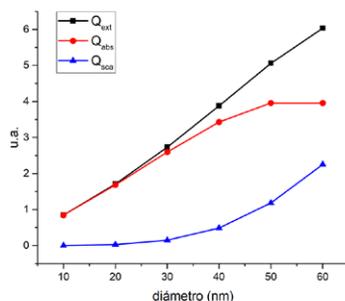
De los espectros recolectados se observó un corrimiento rojo del  $\lambda_{max}$  de las nanoesferas a medida del aumento de diámetro de esta concordando con lo reportado en la literatura<sup>13,14</sup>, este comportamiento se origina por una serie de oscilaciones multipolo para la sección transversal de las nanoesferas.

Los máximos de las bandas de plasmón de las nanoesferas en sus respectivas longitudes de ondas se encuentran resumidos en la tabla 1. Jain *et al.*<sup>15</sup> han reportado cálculos para nanoesferas de oro de 20, 40 y 80, obteniéndose valores similares a los reportados en el presente trabajo.

**Tabla 1.** Relación de longitudes de onda y máximos de banda en función al tamaño de las nanopartículas de oro.

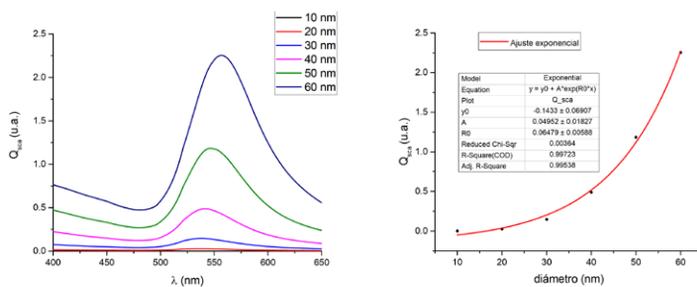
Diámetro (nm)	Longitud de onda (nm)	Máximo de banda (u.a.)
10	528	0,84855
20	525	1,70890
30	527	2,73010
40	532	3,88000
50	538	5,05900
60	546	6,03410

Según la tabla 1, tanto las longitudes de onda como el máximo de banda de absorción se incrementan con el tamaño de las nanopartículas esféricas, ello se ha observado en trabajos experimentales realizados en nuestro laboratorio y en otros trabajos publicados, estos estudios son de mucho interés para evaluar el comportamiento del tamaño y la forma para aplicaciones biomédicas en partículas para su estudio en tratamiento de células cancerígenas<sup>4,15</sup>.



**Figura 9.** Contribución de la absorción y dispersión (scattering).

Se observó un incremento en la contribución de la dispersión en el espectro de extinción a medida que se incrementa el diámetro de la nanopartícula de oro concordando con lo reportado por Jain<sup>14</sup>, presentando un comportamiento exponencial la contribución del espectro de dispersión tal como se observa en la figura 10.



**Figura 10.** Contribución y ajuste de la dispersión (scattering).

## CONCLUSIONES

Según los resultados de simulación obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que la oscilación dipolar del desplazamiento de los electrones respecto a su núcleo metálico positivo resuena con la luz incidente y la respuesta del comportamiento de oscilación colectiva depende del tamaño y la forma de las nanopartículas, en este caso el estudio se realizó sobre partículas esféricas de oro de 10 nm hasta 60nm, cuya longitud de onda de absorción se incrementa a medida que aumenta el tamaño de las nanopartículas desde 528 nm hasta 546 nm.

## AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Vicerrectorado de Investigación por el financiamiento del Proyecto de Investigación N° C17071311 de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 1951; 11:55–75.
2. Willets KA, Van Duyne RP. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annu Rev Phys Chem.* 2007;58(1):267–297.
3. Garate O, Veiga L, Lloret P, Ybarra G. Introducción a los fenómenos ópticos de nanopartículas metálicas a través simulaciones computacionales en línea. *Educ Química.* 2019; 30(1):31–41.
4. Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. *Acc Chem Res.* 2008;41(12):1578–1586.
5. Link S, El-Sayed MA. Optical Properties and Ultrafast Dynamics of Metallic Nanocrystals. *Annu Rev Phys Chem.* 2003; 54(1):331–366.
6. Draine BT, Flatau PJ. Discrete-Dipole Approximation For Scattering Calculations. *J Opt Soc Am A.* 1994; 11(4):1491–1499.
7. Draine BT, Flatau PJ. Discrete-dipole approximation for periodic targets: theory and tests. *J Opt Soc Am A.* 2008;25(11):2693–2703.
8. Eustis S, El-Sayed MA. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Soc Rev.* 2006;35(3):209–217.
9. Tuersun P, Yusufu T, Yimiti A, Sidike A. Refractive index sensitivity analysis of gold nanoparticles. *Optik (Stuttg).* 2017; 149:384–390.
10. Draine BT, Flatau PJ. User Guide for the Discrete Dipole Approximation Code DDSCAT 7.3. [Internet]. 2013. [Consultado 12 junio 2019]. Disponible en: <http://arxiv.org/abs/1305.6497>
11. Botchev MA. Subroutine ZBCG2. [Internet]. 2001. [Consultado 15 julio 2019]. Disponible en: <http://www.staff.science.uu.nl/~vorst102/zbcg2.f90>.
12. Temperton C. A Generalized Prime Factor FFT Algorithm for any  $N = 2^p 3^q 5^r$ . *SIAM J Sci Stat Comput.* 1992;13(3):676–686.
13. Link S, El-Sayed MA. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J Phys Chem B.* 1999; 103(21):4212–4217.
14. Link S, El-Sayed MA. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *Int Rev Phys Chem.* 2000;19(3):409–453.
15. Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *J Phys Chem B.* 2006;110(14):7238–7248.

## **INFLUENCIA DEL PH EN LA LIBERACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF-BB) A PARTIR DE UN HIDROGEL A BASE DE B-QUITOSANO**

Sthefanie Cabrel Rengifo<sup>1\*</sup>, Graciela Untiveros Bermúdez<sup>2</sup>, José Luis Aguilar Olano<sup>3</sup>

### **RESUMEN**

Se desarrolló un hidrogel con matriz de  $\beta$ -QUITOSANO que retarde la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas – BB (PDGF – BB), el cual forma parte del lisado plaquetario (LP), obtenido a partir del plasma rico en plaquetas (PRP). Para la elaboración del hidrogel se preparó la solución de  $\beta$ -QUITOSANO 1,5% (p/v) en ácido acético 2% (v/v), LP al 6% o 12% (v/v) y glutaraldehído a una concentración final de 0,03M. El  $\beta$ -QUITOSANO usado como materia prima, se caracterizó por tener 12,47% de humedad relativa promedio, grado de desacetilación promedio de 94,53% y peso molecular promedio de 145,94 kDa; atributos importantes que permitieron formular un hidrogel de consistencia semi-sólida, incoloro y fácil de manipular. La liberación retardada se logró con el hidrogel con 12% de LP, pues la liberación de PDGF – BB no difiere significativamente ( $p < 0,05$ ) al variar el pH de 6,5 (5 491,42 pg de PDGF – BB/mL de LP) a 7,4 (5 387,39 pg de PDGF – BB/mL de LP) luego de 32 horas. Por el contrario, el hidrogel con 6% de LP, sí mostró una diferencia significativa en la cantidad de PDGF – BB liberado al variar el pH de 6,5 (12 687,66 pg de PDGF – BB/mL de LP) a 7,4 (9 396,58 pg de PDGF – BB/mL de LP) luego de 32 horas.

**Palabras clave:**  $\beta$ -QUITOSANO, hidrogel, liberación retardada, PDGF-BB.

## **INFLUENCE OF PH ON RELEASING PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR (PDGF-BB) FROM A B-CHITOSAN-BASED HYDROGEL**

### **ABSTRACT**

A hydrogel with  $\beta$ -chitosan matrix that retards the release of platelet-derived growth factor - BB (PDGF - BB), which is part of the platelet lysate (LP) obtained from platelet rich plasma (PRP), was developed. The hydrogel was composed of a solution of 1.5% (w/v)  $\beta$ -chitosan in 2% (v/v) acetic acid, 6% or 12% LP (v/v) and glutaraldehyde 0.03M. The  $\beta$ -chitosan used as raw material had 12.47% of average relative humidity, 94.53 of average deacetylation

<sup>1</sup> Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima – Perú, sthefanie.cr@gmail.com

<sup>2</sup> Sección de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima – Perú.

<sup>3</sup> Laboratorio de Inmunología. Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares  
Facultad de Ciencias. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima – Perú.

degree and an estimated average molecular weight of 145.94 kDa; important attributes to formulate a hydrogel of semi-solid consistency, colorless and easy to handle. Delayed release was achieved with the 12 % LP hydrogel since the release of PDGF – BB does not differ significantly ( $p < 0.05$ ) by varying the pH from 6.5 (5 491.42 pg of PDGF – BB/mL of LP) to 7.4 (5 387.39 pg of PDGF – BB/mL of LP) after 32 hours. In contrast, the 6% LP hydrogel show a significant difference in the amount of PDGF-BB released by varying the pH from 6.5 (12 687.66 pg of PDGF – BB/mL of LP) to 7.4 (9 396.58 pg of PDGF – BB/mL of LP) after 32 hours.

**Key words:**  $\beta$ -chitosan, hydrogel, delayed release, PDGF-BB.

## INTRODUCCIÓN

Las úlceras cutáneas son problemas de salud frecuentes cuya cronicidad es el principal detonante de complicaciones, como las infecciones. Por la composición del estrato córneo, el pH superficial basal de la piel está cerca de 5<sup>1</sup>. Sin embargo, ante un daño tisular (o herida) la concentración efectiva de iones hidronio en el medio varía hasta terminar la fase de granulación o proliferación, donde el pH se encuentra alrededor de 7,5<sup>2</sup>. Si la herida llega a esta fase, se la clasifica como aguda o fisiológica; por otro lado, si continúa desordenadamente entre la fase inflamatoria y la proliferativa por más de tres semanas, se la considera crónica o patológica<sup>1</sup>. Este tipo de herida no logra normalizar los valores de pH ácidos debido a las deficiencias en el mecanismo reparador; por lo que se mantiene en medio alcalino, propenso al crecimiento bacteriano<sup>1,2</sup>.

Ante la problemática, diversas terapias que se asemejan al mecanismo reparador natural son estudiadas, como lo es el uso de factores de crecimiento. El factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) es una glicoproteína catiónica con punto isoeléctrico a pH 9,8; que ha demostrado efectividad en acelerar el proceso de cicatrización *in vitro* con el aumento en la proliferación de fibroblastos<sup>3,4</sup>. Sin embargo, los efectos terapéuticos de su aplicación en monoterapia no se comparan con el sinergismo junto a otros factores de crecimiento<sup>4</sup>. Además, uno de los principales inconvenientes del uso de este tratamiento en úlceras cutáneas crónicas, es la inactivación de los factores de crecimiento por altos niveles de metaloproteasas. Es por ello que una liberación funcional con la adecuada matriz que no solo sea compatible, sino que promueva la actividad de los factores de crecimiento, es crucial<sup>5</sup>.

Este trabajo propone un hidrogel como forma farmacéutica que pueda retardar la liberación del PDGF-BB usando una matriz de  $\beta$ -quitosano. La estructura tridimensional estará formada por una red de polímeros entrecruzados con un alto número de grupos o dominios hidrofílicos que, al atraer agua, se “hinchán” hasta llegar a un equilibrio entre la fuerza que ejercen las moléculas del medio al entrar a la matriz (fuerza expansiva) y la fuerza de atracción entre las cadenas del polímero (fuerza retráctil)<sup>6</sup>. El  $\beta$ -quitosano es un polímero con muchas propiedades dependiendo del grado de desacetilación y el peso molecular promedio: antibacteriano, antifúngico, mucoadhesivo, analgésico, hemostático, biodegradable,

biocompatible y promotor de la proliferación celular mediada por factores de crecimiento<sup>5</sup>. Estas redes de quitosano pueden seguir tres mecanismos de encapsulación dependiendo de la IFA cargada: difusión, atrapamiento o unión covalente<sup>6</sup>. Los enlaces covalentes son las uniones por excelencia en la formación de la red, aunque no son las únicas. Los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas juegan un rol importante en la formación de un hidrogel de interacciones físicas<sup>7</sup>.

El objetivo del trabajo es estudiar la influencia del pH (6,5 y 7,4) en la liberación de uno de estos factores de crecimiento (PDGF-BB) a partir de una matriz de  $\beta$ -quitosano bajo dos concentraciones de lisado plaquetaria o LP (6 % y 12 %). Con ello, se sabrá si el diseño de la forma farmacéutica es teóricamente efectivo en el tratamiento de úlceras cutánea. Se espera que la formulación contenga suficientes uniones covalentes y/o iónicas entre la proteína y el polímero para que, al exponerse a variaciones en el pH del medio, como ocurre en las úlceras cutáneas, retarde la liberación de PDGF-BB.

## PARTE EXPERIMENTAL

El polímero de  $\beta$ -quitosano fue provisto por el Laboratorio de la Unidad de Biominería y Medio Ambiente de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. La muestra de PRP se obtuvo de un individuo sano sometido a plasmaféresis posterior al consentimiento informado, en cumplimiento a las buenas prácticas clínicas a cargo del Laboratorio de Inmunología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Para la cuantificación de PDGF-BB humano se usó el Kit DuoSet ELISA Development Systems: R&D Systems (Número de catálogo: DY220).

### Caracterización del $\beta$ -Quitosano

La materia prima fue triturada con un molino analítico modelo 4301 – 02, 50/60 Hz, 180 W, 20 000 RPM, marca Cole-Parmer Instrument Co. y tamizada por malla de acero W.S. TYLER n°60, para tener un tamaño de partícula homogéneo. El % humedad relativa se determinó por gravimetría, llevando a peso constante (diferencia de 0,05 g) una cantidad de muestra expuesta a 105 °C<sup>(8)</sup>.

El grado de desacetilación (GD) se determinó mediante una valoración potenciométrica. Se disolvió  $\beta$ -quitosano en un exceso conocido de HCl 0,2N; la misma que fue titulada con una solución de NaOH 0,05N. Las medidas de pH fueron graficadas identificando dos puntos de inflexión; la diferencia en mililitros entre ambos puntos corresponde al ácido consumido para la protonación de grupos amino, los que permiten determinar el GD del quitosano<sup>8</sup>.

La siguiente ecuación se usó para calcular el GD:

$$GD = 100 - \frac{100 \times \text{Normalidad}_{\text{NaOH}} \times V \times \text{PEq}_{\text{NH}_2}}{\text{Peso de la muestra}}$$

Donde: V es la diferencia de volúmenes (litros) entre el segundo y primer punto de inflexión y PEq (NH<sub>2</sub>) es 16,02258 g/Eq.

Para hallar el peso molecular promedio se aplicó su relación a la viscosidad intrínseca. Para ello se usó un viscosímetro de Ostwald con diámetro 0,5 mm y a condiciones ambientales controladas ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ ). El solvente usado fue Ácido acético 0,3M / Acetato de Sodio 0,2M<sup>8,9</sup>. La ecuación usada fue la de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = KM_v^{\alpha}$$

Donde  $[\eta]$  es la viscosidad intrínseca,  $M_v$  es el peso molecular promedio,  $K$  y  $\alpha$  son constantes dadas para un sistema soluto-solvente. Para la ecuación se consideraron los valores de 0,076 mLg<sup>-1</sup> y 0,76 para  $\alpha$  y  $K$ , respectivamente; en función del GD, origen del quitosano y solvente usado<sup>10</sup>.

### Elaboración del hidrogel, incubación y cuantificación de PDGF-BB

El experimento sigue un diseño factorial fraccionado de dos niveles: %LP y pH del medio de liberación.

El LP derivó del PRP obtenido tras someter a un donante sano a una plasmaféresis por centrifugación de flujo discontinuo. Este procedimiento permite la separación del plasma de los otros componentes sanguíneos, logrando obtener al finalizar un pool de plasma puro y rico en plaquetas, que para este trabajo tuvo una concentración de  $1,5 \times 10^6$  plaquetas.

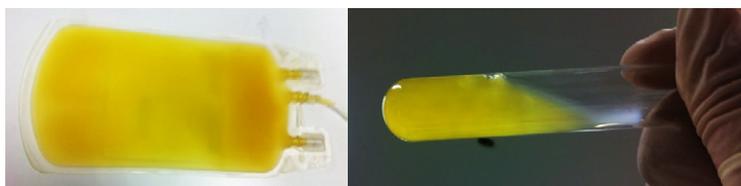


Figura 1. Plasma recolectado tras plasmaféresis por centrifugación de flujo discontinuo.

Para obtener el LP, se tomó 10 mL del PRP y sometió a un shock de temperatura para lizar de plaquetas. Para esto, se congeló a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12 horas y descongeló a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (aproximadamente 10 minutos), lo que se denomina un ciclo. Después de tres ciclos, se centrifugó la muestra a 2500 rpm durante 15 minutos; el sobrenadante es el LP<sup>11</sup>.

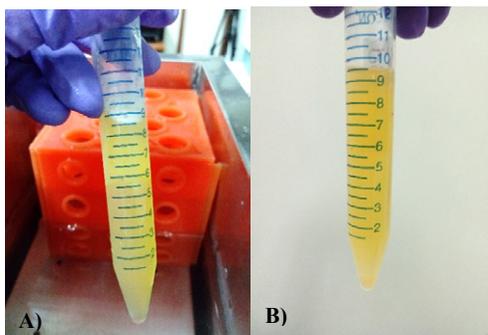
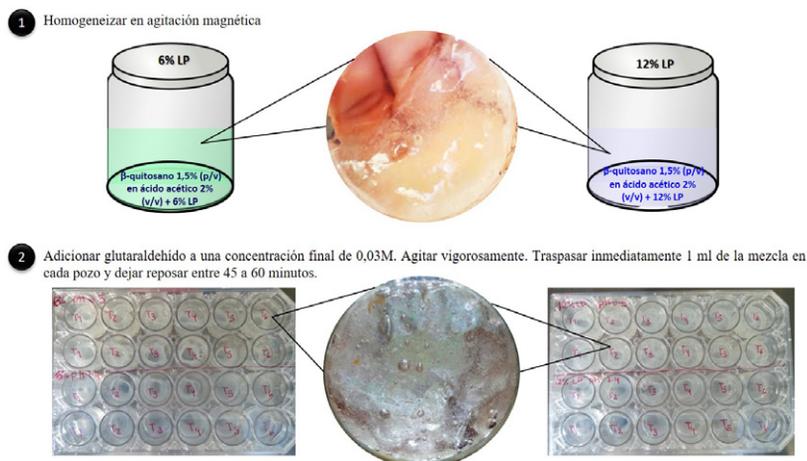


Figura 2. A) PRP en descongelamiento B) PRP post centrifugación.

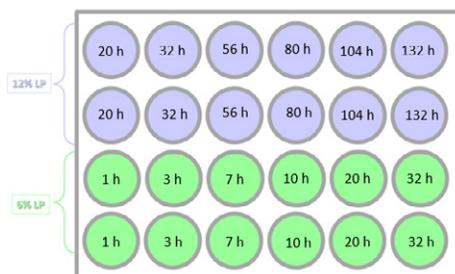
Para la elaboración del hidrogel, se preparó la solución de  $\beta$ -quitosano 1,5% (p/v) en ácido acético 2% (v/v)<sup>12,13</sup>, luego se adicionó LP al 6 % o 12 % (v/v) hasta homogeneizar con ayuda de un agitador magnético. Por último, se adicionó glutaraldehído al 25 % con una concentración final de 0,03M<sup>12</sup> e inmediatamente agitar vigorosamente. Sin dejar reposar más de un 1 minuto, se traspasó 1 ml de la mezcla en cada pozo de la placa de 24 pozos y se dejó reposar entre 45 a 60 minutos.



**Figura 3.** Formación del hidrogel.

En referencia al pH del medio, a cada pozo con el hidrogel de la placa se agregó 400  $\mu$ L del PBS a un pH determinado (6,5 o 7,4). Es importante cumplir con el tiempo de reposo para la completa formación del hidrogel antes de colocar el PBS; de lo contrario, la consistencia del mismo puede destruirse.

Una vez colocado el PBS, la placa permaneció en la incubadora (5 % CO<sub>2</sub>) hasta llegar el tiempo para las cuantificaciones de PDGF-BB, las cuales se realizaron por triplicado de cada pozo, bajo las especificaciones del producto DuoSet<sup>®</sup> ELISA para PDGF-BB (Número de Catálogo: DY220).



**Figura 4.** Esquema de distribución de la placa para el experimento según el tiempo para las cuantificaciones de PDGF-BB.

### Pruebas estadísticas para el contraste de hipótesis

Se comparó la concentración de PDGF-BB como variable numérica en dos grupos no relacionados en base al porcentaje de lisado plaquetario. Los datos en ambos grupos fueron sometidos a pruebas de normalidad, linealidad y homogeneidad de varianzas, habiéndose decidido usar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización del $\beta$ -Quitosano:

El  $\beta$ -Quitosano usado como materia prima se caracterizó por un tamaño de partícula de 250  $\mu\text{m}$  como máximo y un porcentaje de humedad relativa promedio de  $12,47 \pm 0,24$ . El grado de desacetilación promedio (GD) expresado en porcentaje, una de sus principales características, fue de  $94,53 \pm 0,84$ . Mientras que el peso molecular promedio estimado fue de 145,94 kDa ( $R^2 = 0,9876$ ).

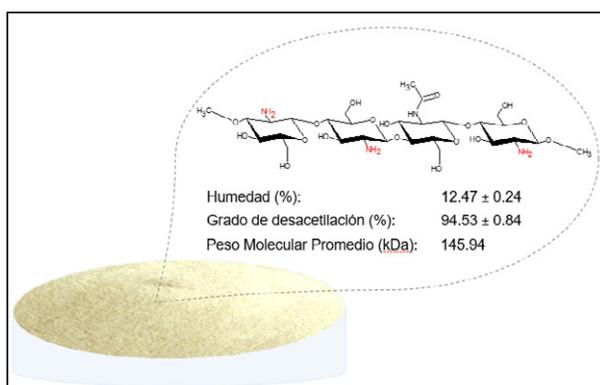


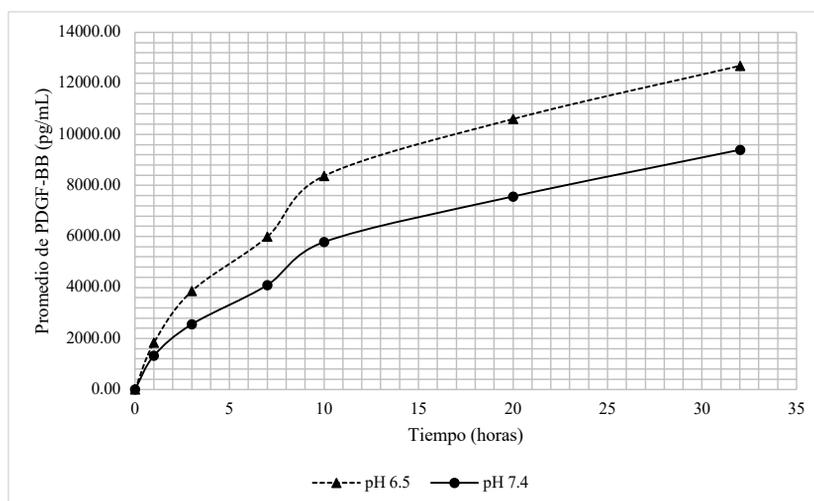
Figura 5. Caracterización del  $\beta$ -Quitosano.

### Cuantificación de la concentración de PDGF-BB *in vitro*:

La cantidad de PDGF-BB liberada en el tiempo a partir del hidrogel con 6 % de lisado plaquetario difiere al variar el pH de 6,5 a 7,4. Tal y como muestra la tabla 1, durante las 32 horas, las concentraciones de PDGF-BB alcanzadas a pH de medio 6,5, fueron superiores a aquellas concentraciones halladas a pH de medio 7,4. Como se observa en la figura 3, ambas curvas siguen una tendencia similar; además, transcurrida una hora las concentraciones difieren en un 27 %; a las 3 horas, 33 %; a las 7 y 10 horas, 31 %; a las 20 horas, 29 % y a las 32 horas, 26 %.

**Tabla 1.** Concentraciones promedio de PDGF-BB (pg/mL) a partir de hidrogeles con 6 % de lisado plaquetario en medios con pH 6,5 y pH 7,4.

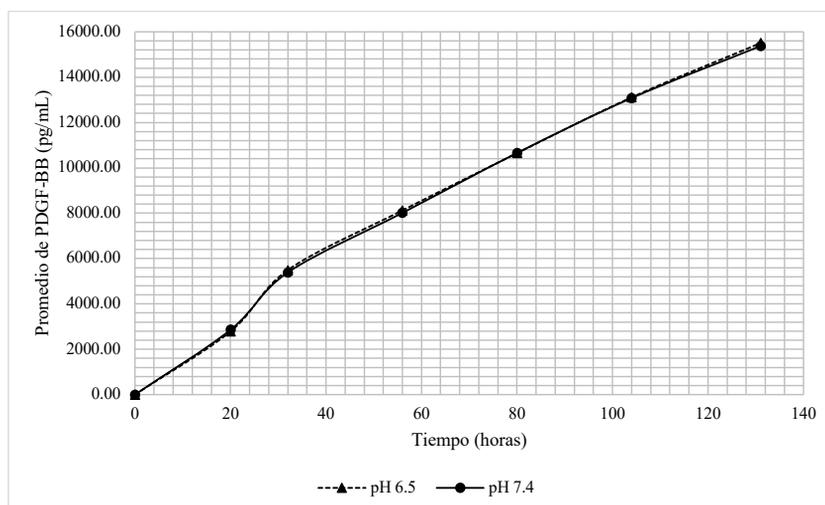
Tiempo (horas)	Concentración promedio de PDGF-BB (pg/mL) liberado	
	En medio con pH 6,5	En medio con pH 7,4
0	0,00	0,00
1	1827,14	1321,61
3	3852,28	2555,97
7	5986,64	4091,70
10	8370,75	5780,86
20	10604,03	7566,17
32	12687,66	9396,58

**Figura 6.** Distribución de las concentraciones promedio de PDGF-BB (pg/mL) a partir de hidrogeles con 6 % de lisado plaquetario en medios con pH 6,5 y pH 7,4.

Por el contrario, de acuerdo a la tabla 2 y la figura 4, la cantidad de PDGF-BB liberada en el tiempo a partir del hidrogel con 12 % de lisado plaquetario no difiere al variar el pH de 6,5 a 7,4.

**Tabla 2.** Concentraciones promedio de PDGF-BB (pg/mL) a partir de hidrogeles con 12 % de lisado plaquetario en medios con pH 6,5 y pH 7,4.

Tiempo (horas)	Concentración promedio de PDGF-BB (pg/mL) liberado	
	En medio con pH 6,5	En medio con pH 7,4
0	0,00	0,00
20	2784,36	2856,95
32	5491,42	5387,39
56	8123,47	8014,33
80	10647,11	10655,14
104	13111,28	13079,27
131	15503,00	15372,99

**Figura 6.** Distribución de las concentraciones promedio de PDGF-BB (pg/mL) a partir de hidrogeles con 12 % de lisado plaquetario en medios con pH 6,5 y pH 7,4.

### Contraste de hipótesis

Los datos para los dos grupos: hidrogel con 6 % de LP e hidrogel con 12 % de LP, siguen una distribución normal, mas no presentan linealidad ni homogeneidad de varianza. Es así que se usó la prueba de Kruskal-Wallis para contrastar la hipótesis nula en ambos grupos. Los resultados, como muestra la tabla 3, respaldan las figuras 3 y 4.

**Tabla 3.** Contraste de hipótesis con la prueba Kruskal-Wallis.

Hidrogel con	Hipótesis nula	Significancia (p)	Decisión
6 % LP	La distribución de concentración de PDGF-BB (pg/mL) es la misma entre las categorías de pH.	< 0,05	Rechaza la hipótesis nula
12 % LP	La distribución de concentración de PDGF-BB (pg/mL) es la misma entre las categorías de pH.	> 0,05	Conserva la hipótesis nula

Se muestran significancias asintóticas. El nivel de significación es 0,05.

Trabajos como el de Yang *et al*, 2011 argumentan que la aplicación de PRP en úlceras inducidas en ratas no tiene actividad cicatrizante; esto debido a la liberación instantánea de factores de crecimiento (FCs) y el número limitado de receptores. Como consecuencia, la fracción de FCs que no llegó a unirse a su receptor, se inactiva, influyendo negativamente en el proceso cicatrización<sup>14</sup>. Es por ello la importancia de usar quitosano como matriz de formas farmacéuticas, y así lograr retardar la liberación<sup>12,13</sup>.

El quitosano no es una entidad química, por lo que es necesario caracterizar la muestra usada en cada investigación. Como se aprecia en la figura 2, las características del  $\beta$ -quitosano como GD elevado (94,53 %) y PM bajo (145,94 kD)<sup>9,10</sup>, otorgan al  $\beta$ -quitosano propiedades particulares como buena solubilidad, mayor participación en interacciones iónicas, actividad antimicrobiana y fungistática; todas ellas basadas en la presencia de mayor cantidad de grupos amina. Estos grupos funcionales son potencialmente protonables, lo que mejora la solubilidad, interacciones iónicas y la actividad fungistática. Por otro lado, la actividad antimicrobiana depende más del PM, el cual mientras menor sea, facilita el movimiento e interacción con la membrana celular del microbio<sup>15,16</sup>.

La forma farmacéutica propuesta hace uso de este  $\beta$ -quitosano como matriz en el hidrogel para retardar la liberación de PDGF-BB, cuya medición con respecto al tiempo se muestra en las figuras 3 y 4. La figura 3 muestra que la liberación de PDGF-BB del hidrogel elaborado con 6 % de LP sí está influenciada por el pH. La tendencia de ambas curvas es similar, pues la liberación de PDGF-BB se da de manera muy rápida, conocido como efecto burst. La influencia del pH en la liberación de PDGF-BB se explica al considerar la composición de aminoácidos y su punto isoeléctrico (pH 9,8). Expuestos a un medio ligeramente ácido (pH 6,5), la gran cantidad de aminoácidos básicos y polares estarán en su forma catiónica; algunos de los aminoácidos polares estarán en su forma neutra y/o cargados positivamente; los aminoácidos ácidos estarán en su forma neutra y/o cargado positivamente; mientras que los aminoácidos básicos, estarán cargados positivamente. Todo conlleva a una repulsión de cargas entre PDGF-BB y la matriz de  $\beta$ -quitosano de manera brusca.

La figura 4 demuestra que la liberación de PDGF-BB del hidrogel elaborado con 12 % de LP no está influenciada por el pH. En este caso las curvas además de seguir la misma tendencia, llegan a superponerse. Estos resultados no pueden ser explicados solo por interacciones iónicas, pues de ser así se verían influenciados por el pH. Es válido pensar que el aumento en el porcentaje de LP implica un aumento de los grupos reactivos para generar nuevos enlaces covalentes. Pero, no todos estos enlaces son fuertes. La formación de bases de Schiff es otra posible reacción entre los grupos ceto o carboxilo, presente en aminoácidos de PDGF-BB con las aminas secundarias del  $\beta$ -quitosano para generar enlaces imina. Estos enlaces son fácilmente hidrolizables a pH ácidos y estables en pH neutros o alcalinos<sup>7,15</sup>.

En el mismo trabajo de Yang *et al*, 2011 la liberación sostenida de PDGF-BB a partir de un gel de fibrina-heparina lo atribuye a interacciones electrostáticas entre los FCs y la heparina (macromolécula aniónica)<sup>14</sup>. Esta es la razón por la cual esta forma farmacéutica incluye glutaraldehído en pequeñas concentraciones con la finalidad de asegurar la liberación retardada. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo dan motivos para no excluir la formación de enlaces imina ni interacciones iónicas, abriendo la posibilidad de prescindir el uso de glutaraldehído.

La figura 4 consolida el logro de diseñar una forma farmacéutica que retarde la liberación de PDGF-BB usando un hidrogel cuya matriz de  $\beta$ -quitosano carga 12 % de LP. No obstante, una de las grandes interrogantes es conocer realmente cómo es que PDGF-BB se entrapa a la matriz de  $\beta$ -quitosano. Los argumentos previos son especulaciones hechas a partir de la teoría, pues se requerían de otros equipos para demostrar la formación de nuevos enlaces.

## CONCLUSIONES

- El  $\beta$ -quitosano con el que se trabajó, tiene 12,47 % de humedad, un grado de desacetilación de 94,53 % y peso molecular promedio de 145,94 kD.
- La liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB del hidrogel de  $\beta$ -quitosano con 6 % de lisado plaquetario sí está influenciada por el pH ( $p < 0,05$ ).
- La liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB del hidrogel de  $\beta$ -quitosano con 12 % de lisado plaquetario no está influenciada por el pH ( $p > 0,05$ ).

## AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), de acuerdo al contrato N° 149-PNICP-PIAP-2015.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Schreml S, Szeimies R-M, Karrer S, Heinlin J, Landthaler M, Babilas P. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. *J Eur Acad Dermatol.* 2010;24(4):373-378.
2. Boateng J, Catanzano O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing-A Review. *J Pharm Sci.* 2015;104(11):3653-3680.
3. Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, Schönberger JPAM, Hoffmann J, Overdevest EP, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol.* 2006;38(2):174-187.
4. Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84(21):7696-700.
5. Busilacchi A, Gigante A, Mattioli-Belmonte M, Manzotti S, Muzzarelli RAA. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohydr Polym.* 2013;98(1):665-676.
6. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(1):83-99.
7. Nakamatsu J, Rodríguez N. Química de la Quitina y el Quitosano. En: *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones.* 1° Edición. Lima – Perú: Fondo Editorial de la PUCP; 2004. p. 74-102.
8. Arguelles W, Heras A, Acosta N, Galed G, Gallardo A, Miralles B, Peniche C, San Román J. Caracterización de Quitina y Quitosano. En: *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones.* 1° Edición. Lima – Perú: Fondo Editorial de la PUCP; 2004. p. 155-206.
9. Kasai MR. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydr Polym.* 2007;68(3):477-488.
10. Rinaudo M, Milas M, Dung PL. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int J Biol Macromol.* 1993;15(5):281-5.
11. Seabaugh KA, Thoresen M, Giguère S. Extracorporeal Shockwave Therapy Increases Growth Factor Release from Equine Platelet-Rich Plasma in vitro. *Front Vet Sci.* 2017 Dec 7;4:205. doi: 10.3389/fvets.2017.00205.
12. Beppu MM, Vieira RS, Aimoli CG, Santana CC. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. *J Membrane Sci.* 2007;301(1-2):126-130.

13. Kutlu B, Tiğlı Aydın RS, Akman AC, Gümüşderelioglu M, Nohutcu RM. Platelet-rich plasma-loaded chitosan scaffolds: Preparation and growth factor release kinetics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101(1):28-35.
14. Yang HS, Shin J, Bhang SH, Shin J-Y, Park J, Im G-I, et al. Enhanced skin wound healing by a sustained release of growth factors contained in platelet-rich plasma. *Exp Mol Med*. 2011; 43(11): 622–629.
15. Pastor de Abram A, Higuera I. Generalidades. En: *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones*. 1° Edición. Lima – Perú: Fondo Editorial de la PUCP; 2004. p. 25-71.
16. Goy RC, Britto D de, Assis OBG. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*. 2009;19(3):241-247.

## MODELOS DE MIGRACIÓN DEL PLOMO DE DOS ENVASES CELULÓSICOS EN CONTACTO CON SIMULANTE DE ALIMENTOS

Gerson Martín Cabrejos Hurtado<sup>\*a</sup>, Walter Francisco Salas Valerio<sup>a</sup>

### RESUMEN

El objetivo de la investigación fue estimar modelos matemáticos para la migración del plomo ( $\mu\text{g/l}$ ) desde una matriz celulósica hacia un simulante de alimentos de pH neutro, tomando dos variables independientes: la migración total ( $\text{mg/dm}^2$ ) y el área de contacto ( $\text{dm}^2$ ), utilizando la regresión lineal múltiple. Las muestras evaluadas fueron dos envases celulósicos destinados al contacto con alimentos, siendo la procedencia de la celulosa de Chile y Brasil. Los ensayos de migración total y específica se realizaron con las metodologías de la Resolución N°12 del MERCOSUR (1995) y el método 3111 B de la APHA (2005), respectivamente, bajo condiciones de contacto prolongado y a una temperatura de  $50^\circ\text{C}$ . Los resultados de esta investigación demuestran que sólo el modelo para la celulosa de Brasil ( $Y = -55,864 - 0,304X_1 + 9,173X_2$ ) resultó adecuado estadísticamente para realizar pronósticos, siendo su coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,899. Del análisis estadístico descriptivo, la variable migración específica del plomo con respecto a las variables migración total y área presentaron relación lineal, según el estadístico de Pearson (0,854/0,944). El modelo para la celulosa de Chile ( $Y = 0,113 + 1,386X_1 - 0,085X_2$ ) obtuvo un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,615 y una moderada relación lineal entre las variables según el estadístico de Pearson (0,784/0,538), siendo el modelo no adecuado para realizar pronósticos.

**Palabras clave:** envases celulósicos, migración total, migración específica, plomo.

## MODELS OF LEAD MIGRATION OF TWO CELLULOSE CONTAINERS IN CONTACT WITH FOOD SIMULANT

### SUMMARY

The objective of the research was to estimate mathematical models for lead migration ( $\mu\text{g/l}$ ) from a cellulose matrix using a neutral pH food simulant, taking two independent variables: total migration ( $\text{mg/dm}^2$ ) and the contact area ( $\text{dm}^2$ ), using multiple linear regression. The evaluated samples were two cellulose containers destined to the contact with food, being

---

<sup>a</sup> Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina S/N, Lima, Perú.

\* gerson.cabrejos@ciplima.org.pe

the origin of the cellulose from Chile and Brazil. Total and specific migration tests were carried out with the methodologies of Resolution No. 12 of MERCOSUR (1995) and method 3111 B of APHA (2005) respectively, under conditions of prolonged contact and at a temperature of 50 °C. The results of this research show that only the model for Brazilian pulp ( $Y = -55,864 - 0,304X1 + 9,173X2$ ) was statistically adequate to make forecasts, with its correlation coefficient ( $R^2$ ) of 0,899. From the descriptive statistical analysis, the variable specific migration of lead with respect to the variables total migration and area presented a linear relationship, according to the Pearson (0,854/0,944) statistic. The model for Chilean pulp ( $Y = 0,113 + 1,386X1 - 0,085X2$ ) obtained a correlation coefficient ( $R^2$ ) of 0,615 and a moderate linear relationship between the variables according to the Pearson (0,784/0,538) statistic, being the model not suitable for forecasting.

**Key words:** cellulose containers, total migration, specific migration, lead.

## INTRODUCCIÓN

Siendo la celulosa un polímero natural de amplio uso en la industria, la transformación en envases para contacto directo con alimentos no está libre de la exposición al plomo, por ello es necesario un control durante la producción y distribución. Con el creciente uso de fibras celulósicas provenientes del material reciclado en la fabricación de envases en contacto con alimentos, existe la preocupación por el riesgo de migración de elementos tóxicos para los alimentos<sup>1,2,3,4,5</sup>. El material reciclado varía en el origen y puede incluir papeles-cartones conteniendo: tintas de impresión, adhesivos, ceras, colorantes, entre otros aditivos<sup>1,4</sup>. Los contaminantes que han sido encontrados frecuentemente en materiales celulósicos reciclados incluyen dioxinas y furanos, ftalatos, hidrocarburos policíclicos aromáticos y elementos potencialmente tóxicos como el plomo<sup>3</sup>. La presencia de trazas de elementos potencialmente tóxicos en envases celulósicos para alimentos es un problema que está relacionado con la calidad final de los alimentos comercializados, pues estos elementos pueden migrar para el alimento en cantidades superiores a los límites de migración total o específica, representando un riesgo para la salud. Diversos investigadores evidenciaron plomo en la composición de envases celulósicos para alimentos bajo diferentes técnicas analíticas: ICP-MS (0,1-6,6 mg/kg)<sup>6</sup>; SS-GF-AAS (0,14-6,60 mg/kg)<sup>7</sup>; FAAS (0,75-9,84 mg/kg)<sup>8</sup>. De los estudios realizados por los autores se evidencia que la celulosa utilizada como material en contacto con alimentos presenta cantidades relevantes de plomo, por ello recomiendan realizar monitoreos del plomo como control de la inocuidad de los envases celulósicos en contacto con alimentos<sup>6</sup>.

Siendo los ensayos de migración específica no comerciales para el uso de las industrias, además, presentan factores particulares como: simulantes, técnica espectrométrica, entre otras; hacen que pocas o ninguna industria los realice. Por estos motivos investigadores proponen modelos matemáticos que reemplacen los ensayos de migración bajo condiciones predeterminadas, por ejemplo: en el modelamiento de la migración de aditivos de acrilonitrilo butadieno estireno para el agua como simulante<sup>9</sup>; en la migración del monómero de cloruro de vinilo de botellas de PVC para alimentos<sup>9</sup>; en el modelo cinético a través de un proceso

de sorción/desorción para migrantes de bajo peso molecular capaces de difundirse a través del polímero<sup>10</sup>; otros autores desarrollaron la teoría del volumen libre, incluyendo hasta las moléculas grandes como los plastificantes<sup>9</sup>. Existe numerosa investigación sobre modelos de migración en materiales poliméricos sintéticos comparado con polímeros naturales.

El autor, en su investigación, propone un modelo de desorción del cadmio ( $\mu\text{g/l}$ ) a partir de tres variables independientes: concentración inicial ( $\text{mg/kg}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y tiempo ( $\text{min.}$ ), desde un material celulósico hacia agua como simulante. Su modelo obtuvo un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,92 y de 0,91 para los resultados de validación, recomendando este para estimar pronósticos<sup>2</sup>.

Además de los trabajos sobre modelos para migración, pocos datos prácticos fueron publicados para evaluar esos modelos, siendo estos concentrados en sustancias que migran de forma independiente, aproximándose a los modelos ficknianos, como la migración de monómeros para simulantes acuosos. El desarrollo de modelos matemáticos para la migración tiene muchas ventajas, sin embargo, todavía no pueden sustituir a los ensayos de migración en la evaluación del potencial de contaminación del alimento por sustancias químicas procedentes del envase<sup>9</sup>.

En ese contexto el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo estimar modelos matemáticos para dos muestras de celulosa, siendo su procedencia de Brasil y Chile. La variable dependiente fue la migración específica del plomo y las variables independientes: la migración total ( $\text{mg/dm}^2$ ) y área de contacto ( $\text{dm}^2$ ), bajo las condiciones de tiempo prolongado y una temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$ . Esta investigación beneficiará a las industrias fabricantes de envases celulósicos y a los consumidores en general, permitiendo utilizar las metodologías y modelos matemáticos propuestos, además de conocer los riesgos asociados a la contaminación con el plomo por materiales en contacto con alimentos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Acondicionamiento de la muestra

Las muestras de envases celulósicos, de origen Brasil y Chile, fueron proveídas de las industrias productoras en Lima-Perú, entregados en bolsas de polietileno y almacenados en un ambiente cerrado alejado de otros compuestos químicos utilizados en el laboratorio de Biotecnología de la FIAL-UNALM, según el procedimiento establecido por la referencia<sup>6</sup>. Las muestras presentaron estructuras de tres y dos pliegos de celulosa equivalente a gramajes de 210 y 170  $\text{gramos/m}^2$ , respectivamente.

En la elección de las características del simulante A, se utilizó agua grado reactivo para análisis clase II que lo establece la referencia<sup>11</sup>, por ser la más apropiada para realizar análisis por presentar menos interferencias durante el análisis espectrométrico de absorción atómica.

### Diseño experimental

Se analizaron dos muestras de envases celulósicos (Chile y Brasil), se redujo el número de repeticiones de cuatro<sup>12</sup> a tres<sup>6</sup> por incrementarse el área de contacto (mayor de 6 dm<sup>2</sup>), siendo también propuesta esa cantidad por la referencia. En cada modelo de regresión se consideraron las áreas obtenidas por los ensayos de migración específica y total, siendo nueve el número total de áreas por modelo.

### Migración total

Las muestras se cortaron en tamaños de acorde al equipo de sujeción, siendo el área aproximada por ensayo de 6 dm<sup>2</sup>, colocándolas en contacto con el simulante A. Se acondicionaron los equipos de sujeción en una estufa a 50 °C por 24 horas, luego se recuperó el extracto de simulante en un vaso precipitado para evaporarlo hasta 5 ml, aproximadamente. Finalmente, se terminó de evaporar el extracto en una mufla a 105 °C hasta peso constante, siendo el residuo obtenido almacenado en un desecador hasta enfriarse y pesarse<sup>12</sup>. Los resultados de migración total se calcularon:  $MT = (\text{Peso del residuo} - \text{Peso del blanco}) / \text{Área de contacto}$ .



Figura 1. Dispositivo de fijación, simulante A y muestra de envase celulósico.

### Migración específica del plomo

Se realizó el ensayo de migración total para obtener el extracto del contacto entre el simulante y las muestras celulósicas<sup>12</sup>, luego se procedió con la determinación del plomo en la muestra líquida según el método de análisis propuesto en referencia<sup>11</sup>. Se transfirieron 250 ml de cada muestra por triplicado a un vaso precipitado, se adicionaron 5 ml de HNO<sub>3</sub> y se calentaron hasta desprendimiento de vapores rojizos. Luego se enfriaron a temperatura ambiente y se disgregaron las sales con 2,5 ml de HCl. Finalmente, se transfirieron las muestras digeridas a un matraz de 25 ml y se aforaron con agua destilada<sup>11</sup>. Se determinaron las concentraciones de plomo con el espectrómetro de absorción atómica novAA 300 (Analytik Jena, Alemania), los resultados de migración específica se calcularon:  $ME = (\text{Concentración de plomo en la muestra} - \text{Concentración de plomo en el blanco}) * \text{Factor de dilución}$ .

### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico descriptivo de las variables (diagrama de cajas, matriz de dispersión, histogramas de frecuencia, coeficientes de Pearson y Spearman) y el modelo matemático (coeficientes de los modelos, bondad de ajuste, significancia de los coeficientes

y el coeficiente de correlación) se utilizó el software SPSS 23 (IBM, USA). Para el análisis de la normalidad de los residuos se utilizó el software Minitab 17 (Minitab Inc., USA).

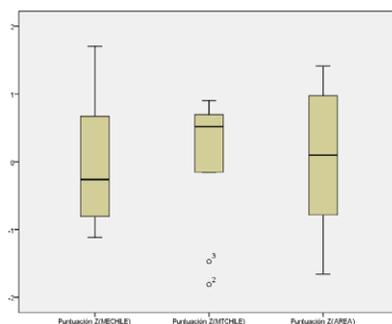
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Migración total y específica - muestra Chile

De la tabla 1 se puede apreciar que los resultados obtenidos para la muestra que proviene de Chile, para la migración total fueron entre 0,84-6,89 mg/dm<sup>2</sup>, dando una media de 4,87 mg/dm<sup>2</sup>. Del análisis descriptivo del diagrama de cajas en la figura 2 se observa asimetría a la izquierda de los valores normalizados (Z), una baja variabilidad de los resultados y dos valores atípicos (0,84;1,60). La variabilidad se debe al rango (6,05 mg/dm<sup>2</sup>) obtenido de los valores originales, siendo la repetición CH1,2 (0,84 mg/dm<sup>2</sup>) muy por debajo de los valores conseguidos, por haberse obtenido de un área inferior (4,86 dm<sup>2</sup>). De los resultados obtenidos de migración específica del plomo se encontraron valores entre 2,00-12,90 µg/l, siendo la media (6,30 µg/l). Del análisis descriptivo del diagrama de cajas en la figura 2 se observa asimetría a la derecha de los valores normalizados (Z), una elevada variabilidad de los resultados y ningún valor atípico. Para la variable área se obtuvieron valores entre 4,86-7,95 dm<sup>2</sup> dando una media de 6,53 dm<sup>2</sup>, del análisis descriptivo los valores presentaron simetría y alta variabilidad.

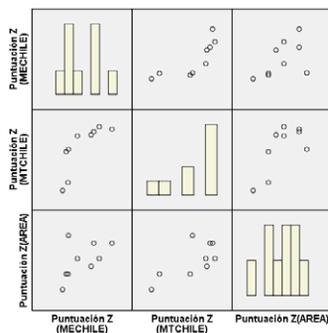
**Tabla 1.** Resultados de los ensayos de migración específica y total de las muestras de Chile.

Repetición	Migración Específica (µg/l)	Migración Total (mg/dm <sup>2</sup> )	Área (dm <sup>2</sup> )
CH1,1	3,30	4,75	7,95
CH1,2	2,00	0,84	4,86
CH1,3	3,20	1,60	5,74
CH2,1	10,10	6,89	6,63
CH2,2	5,30	6,02	6,63
CH2,3	2,80	4,53	5,74
CH3,1	8,30	6,12	6,18
CH3,2	8,90	6,42	7,51
CH3,3	12,90	6,66	7,51



**Figura 2.** Gráfico de cajas de los valores Z para las variables (migración específica, migración total y área) en estudio en la muestra de Chile.

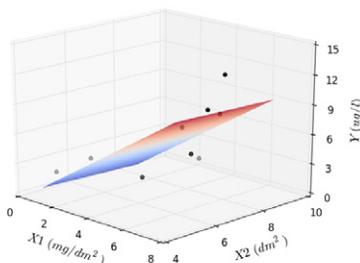
En la figura 3 se presentan los diagramas de dispersión donde se visualiza la moderada relación lineal entre las variables de migración específica y migración total, esto se confirma con el estadístico de Pearson (0,784), mientras que para las variables migración específica y área presentan moderada relación lineal lo cual se visualiza en los diagramas de dispersión y se verifica con el estadístico de Pearson (0,538). Las variables de migración total y área también presentaron moderada relación lineal según los diagramas de dispersión y estadístico de Pearson (0,700).



**Figura 3.** Matriz de dispersión de puntos para los valores Z de las variables (migración específica, migración total y área) en estudio en la muestra de Chile.

### Modelo de migración del plomo – muestra Chile

Del análisis de regresión lineal para las variables en estudio se obtuvo el modelo:  $Y = 0,113 + 1,386X1 - 0,085X2$  y un  $R^2 = 0,615$ ;  $R2_{ajustado} = 0,487$ ;  $Se = 2,76344$ ; el modelo se considera regular por no encontrarse el coeficiente de correlación tan próximo a la unidad, ver figura 4.



**Figura 4.** Modelo de migración del plomo (Y) con respecto a área (X2) y migración total (X1) de las muestras de Chile.

Para la prueba de Anderson Darling para verificar la normalidad de los residuos del modelo, para un  $\alpha = 0,05$  se obtuvo un p valor de 0,183, entonces no se rechaza la hipótesis nula o los residuos tienen distribución normal. Las medidas de influencia en el modelo se estimaron con el estadístico Cook's Distance y se obtuvo un dato influyente, sin embargo, se considera para la presente investigación. La correlación de los residuos del modelo se obtuvo mediante el estadístico de Durbin-Watson y su valor fue de 1,154 concluyendo que los residuos se

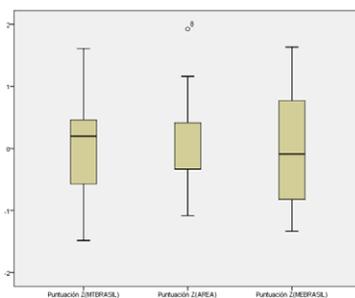
encuentran incorrelacionados. Para la multicolinealidad de las variables del modelo se obtuvo:  $1 < \text{VIF} < 5$ , concluyendo que existe moderada correlación de multicolinealidad. Para determinar la significancia del modelo se realizaron las pruebas de hipótesis para cada coeficiente de las variables ( $H_0: \beta_1=0$ ;  $H_1: \beta_1 \neq 0$ ;  $\alpha = 0,05$ ), se obtuvieron p valores de 0,065 y 0,952 concluyendo el no rechazo de la  $H_0$ , sin embargo, para esta investigación se consideraron los coeficientes del modelo como significativos. Finalmente, para determinar si el modelo es adecuado para realizar pronósticos, se obtuvo la sumatoria de cuadrados totales (SCT) del ANOVA siendo el valor de 119,109, y la sumatoria de los residuos eliminados al cuadrado (PRESS) de 45,809. De los datos anteriores se obtuvo un  $R^2 = 0,615$ , por ello se determina que el modelo no es adecuado para realizar pronósticos.

### Migración total y específica - muestra Brasil

De la tabla 2 se puede apreciar que los resultados obtenidos para la migración total fueron entre 12,62-23,25 mg/dm<sup>2</sup>, dando una media de 16,85 mg/dm<sup>2</sup>. Del análisis descriptivo del diagrama de cajas en la figura 5 se observa simetría de los valores normalizados (Z), una elevada variabilidad de los resultados y ningún valor atípico. De los resultados obtenidos de migración específica del plomo se encontraron valores entre 3,70-17,10 µg/l, siendo la media (9,71 µg/l). Del análisis descriptivo del diagrama de cajas en la figura 5 se observa simetría de los valores normalizados (Z), una elevada variabilidad de los resultados y ningún valor atípico. Para la variable área se obtuvieron valores entre 7,07-8,84 dm<sup>2</sup> dando una media de 7,71 dm<sup>2</sup>, del análisis descriptivo los valores presentaron asimetría a la derecha, alta variabilidad y un valor atípico.

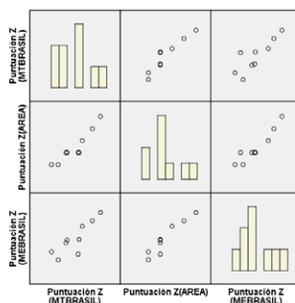
**Tabla 2.** Resultados de los ensayos de migración específica y total de las muestras de Brasil.

Repetición	Migración Específica (µg/l)	Migración Total (mg/dm <sup>2</sup> )	Área (dm <sup>2</sup> )
BR1,1	3,70	12,62	7,07
BR1,2	9,30	14,85	7,51
BR1,3	13,20	18,68	7,95
BR2,1	6,00	10,95	7,07
BR2,2	5,30	17,63	7,51
BR2,3	14,80	21,19	8,39
BR3,1	8,50	14,58	7,51
BR3,2	17,10	23,25	8,84
BR3,3	9,50	17,86	7,51



**Figura 5.** Gráfico de cajas de los valores Z para las variables (migración específica, migración total y área) en estudio en la muestra de Brasil.

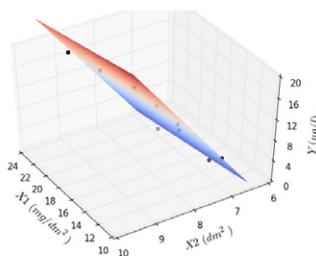
En la figura 6 se presentan los diagramas de dispersión donde se visualiza moderada relación lineal entre las variables de migración específica y migración total, esto se confirma con el estadístico de Pearson (0,854), mientras que para las variables migración específica y área presentan relación lineal, lo cual se visualiza en los diagramas de dispersión y se verifica con el estadístico de Pearson (0,944). Las variables de migración total y área también presentaron relación lineal según los diagramas de dispersión y estadístico de Pearson (0,939).



**Figura 6.** Matriz de dispersión de puntos para los valores Z de las variables (migración específica, migración total y área) en estudio en la muestra de Brasil.

### Modelo de migración del plomo – muestra Brasil

Del análisis de regresión lineal para las variables en estudio se obtuvo el modelo:  $Y = -55,864 - 0,304X_1 + 9,173X_2$  y un  $R^2 = 0,899$ ;  $R^2_{ajustado} = 0,865$ ;  $S_e = 1,65937$ ; el modelo se considera apropiado por encontrarse el coeficiente de correlación próximo a la unidad, ver figura 7.



**Figura 7.** Modelo de migración del plomo (Y) con respecto al área (X2) y migración total (X1) de las muestras de Brasil.

Para la prueba de Anderson Darling para verificar la normalidad de los residuos del modelo, para un  $\alpha = 0,05$  se obtuvo un p valor de 0,856, entonces no se rechaza la hipótesis nula o los residuos tienen distribución normal. Las medidas de influencia en el modelo se estimaron con el estadístico Cook's Distance y no se obtuvieron datos influyentes. La correlación de los residuos del modelo se obtuvo mediante el estadístico de Durbin-Watson y su valor fue de 1,916 concluyendo que los residuos se encuentran incorrelacionados. Para la multicolinealidad de las variables del modelo se obtuvo:  $5 < VIF$ , concluyendo que existe alta correlación de

multicolinealidad, sin embargo para la presente investigación se continuó con los análisis de regresión. Para determinar la significancia del modelo se realizaron las pruebas de hipótesis para cada coeficiente de las variables ( $H_0: \beta_1=0$ ;  $H_1: \beta_1 \neq 0$ ;  $\alpha=0,05$ ), se obtuvieron p valores de 0,505 y 0,019, concluyendo el no rechazo de la  $H_0$  para la variable X1 y el rechazo de la  $H_0$  para la variable X2, sin embargo para esta investigación se consideró el coeficiente de la variable X1 del modelo como significativo. Finalmente, para determinar si el modelo es adecuado para realizar pronósticos, se obtuvo la sumatoria de cuadrados totales (SCT) del ANOVA siendo el valor de 163,709, y la sumatoria de los residuos eliminados al cuadrado (PRESS) de 16,514. De los datos anteriores se obtuvo un  $R^2=0,899$ , por ello se determina que el modelo es adecuado para realizar predicciones.

Se utilizó el método estadístico de regresión lineal múltiple porque existe relación lineal entre las variables en estudio, siendo la transferencia de masa de la migración específica considerada parte de la migración total, además el área de contacto contribuye a un mejor ajuste del modelo. La naturaleza de la fase de contacto polímero/alimento o simulante influencia tanto al coeficiente de difusión como al coeficiente de partición<sup>13</sup>. En este aspecto, el autor clasificó el potencial de migración en tres tipos básicos, siendo nuestro caso de clase III o controlada por el alimento o simulante. De la clase III se puede observar una aproximada relación lineal entre la migración y el tiempo al final de la curva, lo cual refuerza nuestra propuesta del modelo lineal para tiempo prolongado. Otros autores realizaron ensayos sobre la transferencia del cadmio desde pulpa virgen de papel hacia un simulante acuoso neutro, sus resultados demostraron que para periodos de tiempo prolongado la temperatura no es un factor importante después de tres horas de contacto, obteniendo menos del 20 % de migración del analito<sup>2</sup>. Entonces podemos asegurar que la temperatura en nuestro modelo no interfiere en los resultados, a pesar que se mantuvo constante durante los ensayos (50 °C). Otro factor que soporta nuestro modelo lineal es el tiempo prolongado (24 horas), siendo que los autores demostraron que el mayor porcentaje de migración ocurre en las primeras tres horas de contacto<sup>14</sup>, por ello pasado este tiempo la transferencia de masa pasa de un modelo exponencial a uno lineal.

El modelo de migración del plomo de la muestra de Chile ( $Y = 0,113 + 1,386X_1 - 0,085X_2$ ;  $R^2=0,615$ ) no resultó adecuado para realizar pronósticos porque los resultados obtenidos presentaron moderada relación lineal, lo cual no cumple con la teoría sobre la relación directa entre la migración específica y total. Esta relación se cumple para la migración del plomo porque la técnica gravimétrica para determinar la migración total solo separa los compuestos y/o elementos volátiles, además la técnica espectrométrica requiere del extracto obtenido de la migración total.

Los autores de la referencia estimaron un modelo cinético del cadmio en celulosa virgen a través de agua de pH neutro, obtuvieron un  $R^2=0,89$ , concluyendo que su modelo permite realizar pronósticos. Entonces también podemos concluir que nuestro modelo de migración del plomo en la muestra de Brasil ( $Y = -55,864 - 0,304X_1 + 9,173X_2$ ;  $R^2=0,899$ ) es adecuado para realizar pronósticos, el cual permite a los consumidores estimar las concentraciones del plomo bajo las mismas condiciones de ensayo, evitando realizar los ensayos de migración específica.

## CONCLUSIONES

Los modelos de migración del plomo de envases celulósicos en contacto con el simulante A obtenidos fueron: Chile ( $Y = 0,113 + 1,386X_1 - 0,085X_2$ ;  $R^2 = 0,615$ ;  $R^2_{ajustado} = 0,487$ ;  $S_e = 2,76344$ ) y Brasil ( $Y = -55,864 - 0,304X_1 + 9,173X_2$ ;  $R^2 = 0,899$ ;  $R^2_{ajustado} = 0,865$ ;  $S_e = 1,65937$ ), siendo sólo el modelo de Brasil adecuado para realizar pronósticos por los fabricantes y consumidores, según el análisis descriptivo de las variables que determinaron relación lineal y el análisis de regresión lineal múltiple que determinó la significancia del modelo.

## AGRADECIMIENTOS

Al profesor Walter Francisco Salas Valerio de la Facultad de Industrias Alimentarias de la UNALM y al equipo del Laboratorio de Biotecnología de la FIAL-UNALM por su apoyo durante la investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Binderup ML, Pedersen GA, Vinggaard AM, Rasmussen ES, Rosenquist H, Cederberg T. Toxicity testing and chemical analyses of recycled fibre-based paper for food contact. *Food Addit Contam.* 2002; 19:13-28.
2. García GC, Carbonell G, Tarazona JV. Modelling the absorption and desorption of cadmium on paper pulp using kinetic approaches. *Chemosphere.* 2003; 55:869-878.
3. Triantafyllou VI, Akrida-Demertzis PG. Migration studies from recycled paper packaging materials: development of an analytical method for rapid testing. *Anal Chim Acta.* 2002; 467:253-260.
4. Triantafyllou VI, Akrida-Demertzis PG. A study on the migration of organic pollutants from recycled paperboard packaging materials to solid food matrices. *Food Chem.* 2007; 101:1759-1768.
5. Skrzydlewska E, Balcerzak M, Vanhaecke F. Determination of chromium, cadmium and lead in food-packaging materials by axial inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2002; 479:191-202.
6. Castle L, Offen CP, Baxter MJ, Gilbert J. Migration studies from paper and board food packaging materials, 1. Compositional analysis. *Food Addit Contam.* 1997; 14(1):35-44.
7. De Sousa Medeiros P. Desenvolvimentos de métodos analíticos para determinação de As, Cd, Hg, Cr e Pb em embalagens celulósicas para alimentos por espectrometria de absorção atômica e amostragem direta de sólidos. [Dissertação para obtenção do título de Mestre em Química]. Sao Paulo-Brasil: Universidade de Sao Paulo; 2009.
8. Cioban CG. Heavy metal distribution in different type of paper packaging. *Annals of the University of Craiova.* 2015; 20(56):97-100.

9. Correa GE. Estudo do potencial de migração de componentes de embalagens plásticas para produtos gordurosos a altas temperaturas. [Tese para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos]. São Paulo-Brasil: Universidade Estadual de Campinas; 1996.
10. Gilbert SG, Miltz J, Giancin JR. Transport considerations of potential migrants from food packaging materials. *J Food Process Preserv.* 1980; 4:27-48.
11. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 3111 B: Direct Air-Acetylene Flame Method. 21th Edition. Washington-United States of America: American Public Health Association; 2005.
12. Resolución N° 12. Ensayo de migración total de envases y equipamientos celulósicos. Paraguay: Grupo Mercado Común del Sur; 1995.
13. Crosby NT. Food packaging materials: aspects of analysis and migration of contaminants. London-England: Applied Science; 1981.
14. García GC, Carbonell G, Tarazona JV. Binding of cadmium on raw paper pulp: relationship between temperature and sorption kinetics. *Chemosphere.* 2002; 49:533-538.

## PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOSORBENTES BASADOS EN COMPÓSITOS DE MWCNT-MAGNETITA- HIDROXIAPATITA Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS

Golfer Muedas Taipe<sup>\*a</sup>, Andrea Leticia Almandoz Landa<sup>a</sup>,  
Fátima Amanda Santillán Espinoza<sup>a</sup>

### RESUMEN

En el presente estudio, se prepararon nuevos biosorbentes basados en compósitos de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), hidroxiapatita (HAp) y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT). Los materiales preparados fueron caracterizados mediante técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS) espectroscopía infrarroja (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM), magnetometría de muestra vibrante (VSM), espectroscopía Raman y voltamperometría de onda cuadrada. La magnetita sintetizada presentó un comportamiento ferromagnético. La HAp tuvo menor tamaño mediante la síntesis hidrotermal. Además, se evaluó el posible uso del compósito que involucraba a los tres materiales de partida ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /MWCNT/HAp) en la remoción de un metal pesado como As(V) en solución acuosa, teniendo en cuenta la influencia de factores como pH, masa de adsorbente y tiempo de contacto. Se obtuvo los valores máximos de porcentaje de remoción de este metal (mayor a 85 %) a condiciones de pH 6, dosis de adsorbente de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  y un tiempo de contacto de 2 h.

**Palabras clave:** compósitos, magnetita, hidroxiapatita, nanotubos de carbono de pared múltiple, remoción.

## PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BIOSORBENTS BASED ON MWCNT-MAGNETITE-HYDROXYAPATITE COMPOSITES AND ITS POTENTIAL APPLICATION IN THE REMOVAL OF HEAVY METALS

### ABSTRACT

In the present study, new biosorbents based on magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), hydroxyapatite (HAp) and multiple-walled carbon nanotubes (MWCNT) composites were prepared. The materials were characterized by dynamic light scattering (DLS), infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), vibrating sample magnetometry (VSM), raman spectroscopy

<sup>\*a</sup>Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú. E-mail: gmuedast@uni.edu.pe

and square wave voltammetry (SWV). The synthesized magnetite presented a ferromagnetic behavior. HAp was smaller by hydrothermal synthesis. In addition, the possible use of the composite involving the 3 starting materials (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNT/HAp) in the removal of a heavy metal such as As(V) in aqueous solution was evaluated, taking into account the influence of factors such as pH, adsorbent mass and contact time. The maximum values of percentage of removal of this metal (greater than 85 %) were obtained under conditions of pH 6, adsorbent dose of 0.5 g L<sup>-1</sup> and a contact time of 2 hours.

**Key words:** composites, magnetite, hydroxyapatite, multi-walled carbon nanotubes, arsenic, removal.

## INTRODUCCIÓN

Los metales pesados son altamente perjudiciales para la salud humana<sup>1</sup>, incluso a bajas concentraciones debido a su bioacumulación. La variedad de técnicas y procesos de tratamiento químico desarrollados para eliminar a los metales pesados del agua contaminada incluyen principalmente a los procesos de: precipitación<sup>2</sup>, intercambio de iones<sup>3</sup>, nanofiltración y ósmosis inversa<sup>4</sup>, sin embargo, la adsorción se presenta como una mejor alternativa debido a su bajo costo, alta eficiencia, baja probabilidad de formación de productos secundarios y una alta posibilidad de reuso de los materiales adsorbentes<sup>5</sup>.

El uso de partículas magnéticas es un recurso muy utilizado y atractivo por la facilidad de poder usarlos y recuperarlos mediante un campo magnético externo y por su comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente con alta magnetización de saturación<sup>2</sup>, por ello, la magnetita está siendo usada en trabajos que involucran la remoción de metales pesados tóxicos provenientes de terrenos mineros o muy alejados, que es una problemática actual y de gran interés<sup>6</sup>.

La hidroxiapatita ya antes ha sido utilizada en diferentes ámbitos como: producción de materiales fluorescentes<sup>7</sup>, portadores de fármacos<sup>8</sup>, aplicaciones en el campo de biomedicina<sup>9</sup> y medioambiental<sup>10</sup>. Estos usos mencionados se producen debido a que posee ciertas propiedades como: alta estabilidad, compatibilidad ambiental, alta área superficial, actividad fotocatalítica<sup>11</sup>.

Por otra parte, los nanotubos de carbono (CNT), representan materiales de interés actual utilizados como complementos<sup>12</sup> (recipientes con filtros basados en nanotubos de carbono) o en la elaboración de materiales aplicados al tratamiento de una amplia variedad de contaminantes debido a que las nanoestructuras de carbón presentes en ellos le conferirían una mayor superficie de contacto con el contaminante. Estudios revelan la preferencia de utilizar nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) sobre los de pared simple, debido a que estos últimos presentan fuertes tendencias hacia una aglomeración, lo cual disminuiría su efectividad como material adsorbente<sup>13</sup>.

Finalmente, en este trabajo se ha realizado la síntesis de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) recubierta con citrato, síntesis de la hidroxiapatita (HAp) y la preparación de diferentes biosorbentes (compósitos) basados en la combinación de los materiales de partida mencionados, con el fin de poder aplicarlas en la resolución y mejora de problemas relacionados con la calidad del agua.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales

Los reactivos  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$  y citrato de sodio y  $\text{N}_2$  ultrapuro fueron utilizados en la síntesis de la magnetita. El  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  fueron utilizados por diversos métodos para la síntesis de la hidroxiapatita (HAp) y la preparación de los compósitos. Todos los reactivos químicos usados en las síntesis fueron de grado analítico y adquiridos en Merck Peruana S.A. Los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWNCT), utilizados en este trabajo, son de uso comercial y fueron suministrados por Sigma-Aldrich Co., Ltd, Estados Unidos.

### Síntesis de magnetita mediante coprecipitación y estabilización con citrato<sup>2</sup>

La magnetita fue sintetizada utilizando al  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  como precursores metálicos. La preparación consistió básicamente en la precipitación a partir de la mezcla de cloruros (relación molar  $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$  de 2:1) añadiendo gota a gota  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 25 % (10 mL) en agitación continua. El  $\text{NH}_4\text{OH}$  fue utilizado como agente precipitante. La mezcla resultante se lavó cuatro veces con agua ultrapura, se dejó en reposo y finalmente se separó el precipitado de color negro (magnetita) utilizando un campo magnético externo de un imán. La magnetita obtenida se secó durante 1 h a 100 °C. El agua utilizada para la preparación de la mezcla de cloruros y para el recubrimiento con citrato fue sometida a una atmósfera inerte de  $\text{N}_2$  durante 1 h a 25 °C. Para la estabilización con citrato, la magnetita se dispersó en 50 mL de agua ultrapura y se sometió a un baño de ultrasonido durante 5 min. La dispersión obtenida se sometió a un baño María a 70 °C, en esas condiciones, se añadió gota a gota 10 mL de citrato de sodio 0,1 M y se dejó enfriar, manteniendo la agitación por 12 h. La magnetita estabilizada se separó por decantación con ayuda de un imán. Finalmente, se hicieron lavados con agua ultrapura, hasta llevarlo a neutralidad y el material obtenido se secó en estufa.

### Preparación de hidroxiapatita mediante método químico<sup>14</sup>

Se prepararon soluciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,33 M y de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0,12 M. La solución de amonio se adicionó gota a gota sobre la solución de calcio bajo agitación continua durante 1 h a 90 °C. Luego de este tiempo, se añadió por goteo 5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 25 % y se dejó en reposo durante 10 días para la precipitación de la hidroxiapatita. El precipitado obtenido se separó por centrifugación, luego se lavó cuatro veces con agua ultrapura y se secó a 250 °C durante 1 h. Finalmente, el precipitado se calcinó a 1000 °C durante 3 h.

**Preparación de hidroxiapatita mediante método sol-gel<sup>15</sup>**

Se prepararon soluciones de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,6 M y  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  1,0 M, las cuales fueron mezcladas a una velocidad de 1,5 mL/min, en agitación continua durante 1 h a 90 °C, luego de ello se agitó la mezcla durante 1 h adicional hasta completar la reacción. La mezcla resultante se dejó en reposo por 72 h para la precipitación, luego de ello, se procedió a lavar con abundante agua ultrapura hasta neutralidad (pH= 7). Finalmente, el polvo de hidroxiapatita se llevó a la mufla a 1000 °C durante 3 h.

**Preparación de hidroxiapatita mediante método hidrotermal<sup>16</sup>**

Se prepararon soluciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,01 M y  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,0133 M, las cuales fueron mezclados en agitación constante durante 10 min. Luego de ello, se añadió lentamente 15 mL de una solución de  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0,006 M bajo agitación vigorosa. La mezcla resultante se llevó a una autoclave de acero a 150 °C durante 24 h (tratamiento hidrotermal) y el producto obtenido se centrifugó a 15000 rpm durante 10 min. El precipitado se lavó con agua ultrapura tres veces y finalmente se secó a 100 °C durante 1 h.

**Síntesis de compuesto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/HAP<sup>17</sup>**

Se preparó una solución acuosa de 1,85 mmol de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 37,0 mmol de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , a la cual se le agregó 12 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  bajo agitación constante. A esta mezcla se le agregó ácido cítrico 0,1 M (pH=10), bajo calentamiento de 90 °C y atmósfera inerte de  $\text{N}_2$ . El sólido resultante fue obtenido mediante separación con un imán, fue lavado con agua ultrapura y se dejó en reposo durante 10 min. Luego de ello, se adicionó 100 mL de una solución de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1:1 (pH= 11) en agitación continua durante 30 min. La mezcla resultante se sometió a calentamiento a 90 °C durante 2 h. Terminado este proceso, se dejó envejecer el producto por un periodo de 12 h a temperatura ambiente. Finalmente, el compuesto obtenido se filtró varias veces con agua ultrapura hasta llegar a neutralidad y fue secado al vacío.

**Síntesis de compuesto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNT**

Se dispersó 250 mg de MWCNT en una solución acuosa de 1,85 mmol de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 37,0 mmol de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Luego de ello, se agregó 12 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , bajo agitación constante; a la mezcla obtenida se le agregó  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  0.1 M (pH= 10) bajo atmósfera inerte de  $\text{N}_2$  y en calentamiento a 90 °C. El sólido resultante fue separado por decantación con ayuda de un imán y luego fue lavado con agua ultrapura.

**Síntesis de compuesto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNT/HAP**

Para la preparación del compuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}/\text{HAP}$  se utilizó la  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$  preparado anteriormente. A este compuesto se le añadió 100 mL de solución de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1:1 (pH= 11) bajo agitación constante durante 30 min. La mezcla resultante se sometió a calentamiento a 90 °C durante 2 h. Una vez terminado el proceso se dejó envejecer el producto por un aproximado de 12 h a temperatura ambiente. El producto obtenido se filtró varias veces con agua ultrapura hasta llegar a neutralidad para luego ser llevado al vacío y posteriormente a la estufa a 150 °C.

### **Caracterización de los materiales**

Las propiedades magnéticas de los materiales fueron analizados mediante un magnetómetro de muestra vibrante (VSM), construido en el Laboratorio de Materiales Nanoestructurados de la Universidad Nacional de Ingeniería, Perú. Los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) fueron obtenidos usando un espectrómetro de reflectancia total atenuada (ATR, IR-Prestige 21, Shimadzu, Europa) en el rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Asimismo, los grupos funcionales presentes en los diversos materiales sintetizados fueron obtenidos a partir del espectro Raman utilizando un espectrómetro Raman (XploRA, HORIBA Scientific, Francia) con láser de 532 o 785 nm. La morfología y microestructuras de la superficie de los materiales sintetizados y perlas preparadas fueron examinados utilizando el microscopio electrónico de barrido (SEM EVO MA10, Zeiss, Alemania). Las medidas voltamperométricas se realizaron con un potencióstato/galvanostato PalmSens<sup>®</sup> y una celda convencional de tres electrodos: electrodo de trabajo: carbón vítreo, electrodo auxiliar: alambre de platino y electrodo de referencia: electrodo Ag/AgCl saturado con KCl. Como electrolito se utilizaron buffer de fosfato.

### **Pruebas de remoción de metales pesados usando el compósito Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNT/HAp**

Para este caso, se escogió al As(V) dado que es uno de los metales pesados más contaminantes y de actual interés en la comunidad científica.

La remoción del As(V) se realizó utilizando como adsorbente al compósito de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNT/HAp. Esto se debe a que la hidroxiapatita mejora la preferencia de un compuesto a la adsorción de metales y la magnetita le conferiría la capacidad de recuperación y un posible reuso<sup>18</sup>.

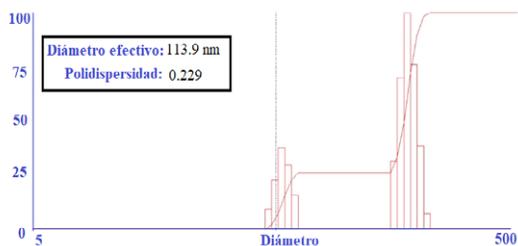
Se evaluó el efecto de pH, para lo cual se utilizó una solución de As(V) 1 mg/L en un rango de pH de 6 a 11, a las cuales se le añadió 10 mg de compósito y se dejó en agitación por 4 h, pasado este tiempo se midió la concentración remanente. Se evaluó el efecto de tiempo de contacto, para lo cual se utilizó 20 mL de una solución de arsénico 1 mg/L y se le añadió 10 mg de compósito, se dejó agitando durante 4 h y luego se midió la concentración remanente. Se evaluó el efecto de masa de adsorbente, para lo cual se trabajó con 20 mL de una solución de arsénico 1 mg/L y se agregó 1,5; 6,2; 10,9; 15,6 y 22,1 mg de compósito y se dejó agitando durante 4 h.

Las concentraciones iniciales y remanente (en todas las pruebas) fueron medidas utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (AA). Luego de cada proceso de remoción realizado, los materiales fueron recuperados con un imán mediante procesos de decantación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

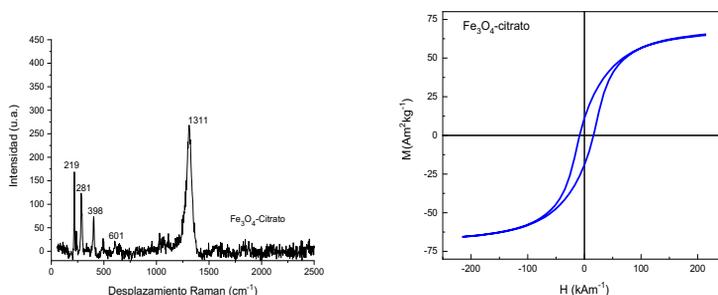
### Caracterización de magnetita

Al utilizar la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) para la magnetita estabilizada con citrato, se obtuvieron partículas con un diámetro efectivo de 113,9 nm y una polidispersidad de 0,229 (figura 1).



**Figura 1.** DLS de la magnetita sintetizada y recubierta con citrato.

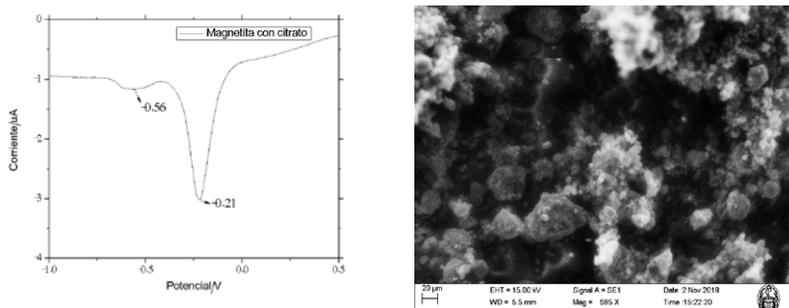
La nanomagnetita estabilizada ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -citrato) fue caracterizada mediante espectroscopía Raman (figura 2), mediante la cual se pudo obtener sus principales picos característicos: a 219 y 281  $\text{cm}^{-1}$  los picos asociados al enlace Fe-O ( $T_{2g}$ ), a 398  $\text{cm}^{-1}$  el pico asociado al OH- presente en la superficie del material, a 601  $\text{cm}^{-1}$  el pico asociado al Fe-O ( $A_g$ ) y finalmente el pico más intenso a 1311  $\text{cm}^{-1}$  asociado al magnón. Por otra parte, se realizó la caracterización de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mediante magnetometría de muestra vibrante, obteniéndose la curva mostrada en la figura 2, la cual indica que el material obtenido muestra un comportamiento ferromagnético<sup>19</sup> y de la cual se obtuvo además los siguientes parámetros: magnetización de saturación (Ms) de 64,2  $\text{Am}^2\text{kg}^{-1}$ , coercitividad cero y magnetización remanente (Mr) de 9,81  $\text{Am}^2\text{kg}^{-1}$ .



**Figura 2.** Espectro Raman (izquierda) y curva de magnetización (derecha) de magnetita estabilizada con citrato ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -citrato).

La magnetita-citrato también fue caracterizada mediante voltamperometría de separación anódica de onda cuadrada (figura 3), obteniéndose dos picos a -0,24 y 0,64 V, los cuales son característicos de la magnetita ya que representan la reducción de dos sitios cristalinos: uno tetraédrico (ocupado por  $\text{Fe}^{+3}$ ) y otro octaédrico (ocupado por  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  en cantidades

iguales). Además, la muestra de magnetita sintetizada fue caracterizada mediante microscopía electrónica de barrido (figura 3), donde se observan cristales con poca aglomeración debido al uso de citrato como agente estabilizante.

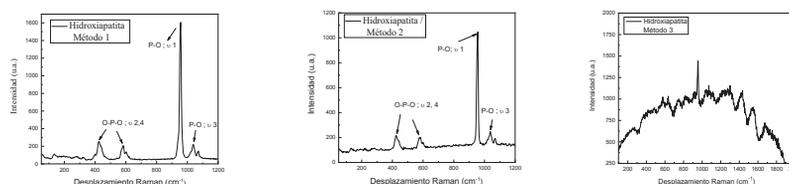


**Figura 3.** Curva de voltamperometría de onda cuadrada (izquierda) y micrografía SEM (derecha) de la magnetita-citrato sintetizada.

### Caracterización de hidroxiapatita

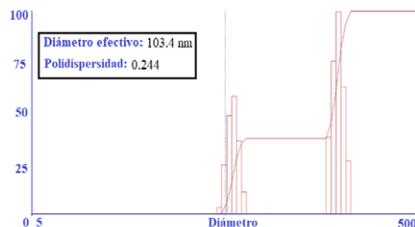
Los tres tipos de hidroxiapatita sintetizadas (método químico, sol-gel e hidrotermal) fueron caracterizadas mediante espectroscopía Raman determinándose la presencia de sus principales picos característicos<sup>20</sup>. La figura 4 muestra los espectros Raman de la hidroxiapatita obtenida mediante método químico (método 1) y de la obtenida mediante método sol-gel (método 2), en ambos, se puede apreciar un pico intenso a  $965\text{ cm}^{-1}$  el cual está asociado al modo  $\nu_1$  del estiramiento totalmente simétrico del grupo  $\text{PO}_4$  (enlace P-O), también se aprecian dos picos de baja intensidad a  $430$  y  $590\text{ cm}^{-1}$  asociados al modo de flexión  $\nu_{2,4}$  de  $\text{PO}_4$  (enlace O-P-O), finalmente se aprecia un pico a  $1020\text{ cm}^{-1}$  asociado al modo de estiramiento asimétrico 3 de  $\text{PO}_4$  (enlace P-O).

El espectro Raman de la hidroxiapatita obtenida mediante el método hidrotermal también se muestra en la figura 4, donde se destaca la presencia del pico a  $961\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 4.** Espectros Raman de la hidroxiapatita (HAp) obtenida mediante el método 1, método 2 y método 3.

La figura 5 muestra los resultados obtenidos al utilizar la técnica de dispersión dinámica de luz, mediante la cual se obtuvieron partículas de hidroxiapatita (método hidrotermal) con un diámetro efectivo de  $103,4\text{ nm}$  y una polidispersidad de  $0,244$ , lo cual corresponde con lo reportado por la bibliografía<sup>16</sup> de que se originan nanopartículas con un tamaño adecuado.



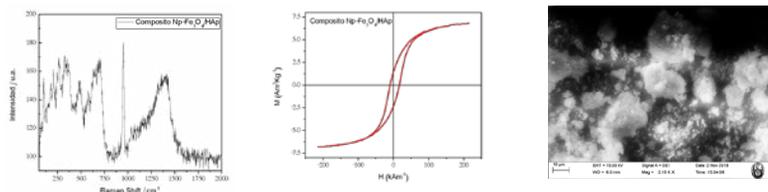
**Figura 5.** Espectros DLS de la hidroxiapatita (HAp) obtenida mediante el método 3.

### Caracterización del compuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{HAp}$

El compuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{HAp}$  fue caracterizado mediante espectroscopía Raman (figura 6), en donde se observó que se mantiene el pico a  $965\text{ cm}^{-1}$  asociado al enlace P-O (modo  $\nu_1$ ) y el pico asociado al magnón se desplaza ( $1393\text{ cm}^{-1}$ ) y pierde ligeramente su forma.

Por otra parte, este compuesto fue caracterizado mediante magnetometría de muestra vibrante (VSM). La curva muestra que se mantiene el comportamiento ferromagnético del material y que los valores parámetros de  $M_s$  y  $M_r$  disminuyen (en comparación de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -citrato) a  $6,25$  y  $1,25\text{ Am}_2\text{kg}^{-1}$ , respectivamente, lo cual se puede atribuir a la interacción de la magnetita con la hidroxiapatita, que es un material que no presenta propiedades magnéticas.

Este compuesto también fue caracterizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), en la cual se observó rugosidad ligera sobre la superficie del material.

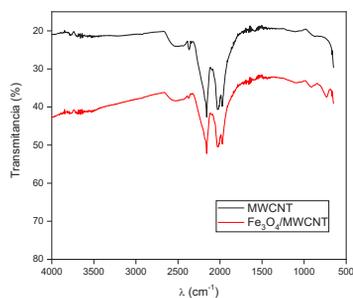


**Figura 6.** Espectro Raman, curva de magnetización y micrografías SEM del compuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HAp.

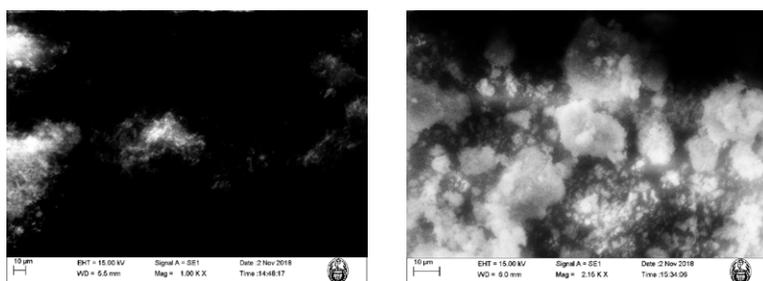
### Caracterización del compuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$

El compuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$  fue caracterizado mediante espectroscopía infrarroja (FTIR). La figura 7 muestra el espectro obtenido del compuesto frente al espectro de los nanotubos, donde podemos observar que los picos asociados a los nanotubos se mantienen en el compuesto y que destaca la presencia del pico a  $690\text{ cm}^{-1}$ , asociado al modo vibracional del Fe-O (uno de los picos característicos de la magnetita).

Por otra parte, el compuesto fue caracterizado mediante microscopía SEM. La figura 8 muestra las micrografías de los nanotubos de carbono comerciales y del compuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$ , en ellas podemos apreciar la aglomeración de los nanotubos (derecha) y una mayor dispersión de ellos en la formación del compuesto (izquierda).



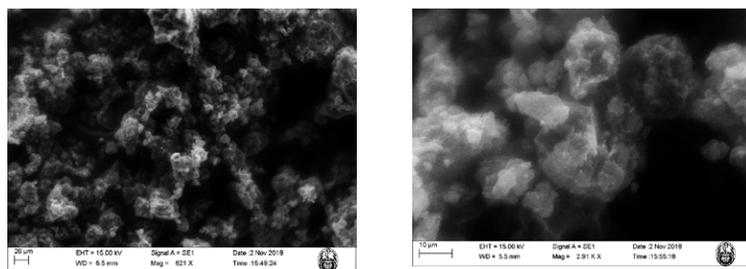
**Figura 7.** Espectros FTIR de los nanotubos de carbono (MWCNT) y el compuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$ .



**Figura 8.** Imágenes SEM de los nanotubos de carbono (MWCNT) (derecha) y del compuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$  (izquierda).

### Caracterización del compuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}/\text{HAp}$

El compuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}/\text{HAp}$  también fue caracterizado mediante microscopía SEM (figura 9). En las figuras, se pudo observar la superficie rugosa del material, algunas regiones cavernosas, que podrían asociarse a la aglomeración del agente porogénico en el proceso de coprecipitación de la muestra.



**Figura 9.** Imágenes SEM del compuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}/\text{HAp}$ .

## Pruebas de remoción de metales pesados

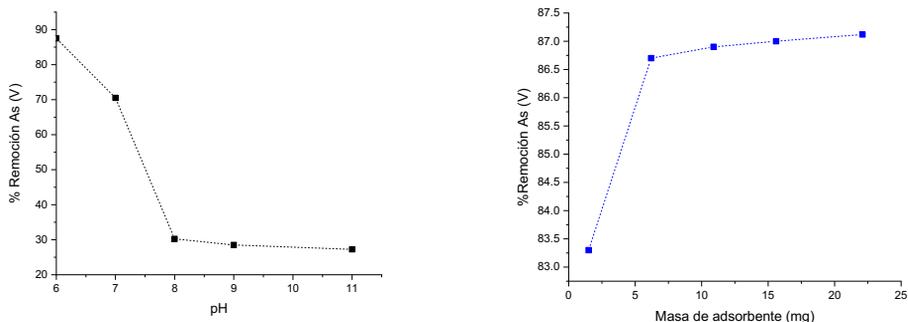
### Efecto del pH

Se eligió un rango de pH a partir de 6, en base a que lo reportado por la literatura, a partir de este valor se manifiesta una mejor eficiencia en el proceso de adsorción.

La figura 10 (izquierda) muestra una gráfica de porcentaje de remoción en función al pH. Se observó valores más altos porcentaje de remoción a un pH 6 frente al resto de valores de pH probados (7, 8, 10 y 11), lo cual coincide con lo reportado por trabajos anteriores<sup>21</sup>.

### Efecto de masa de adsorbente

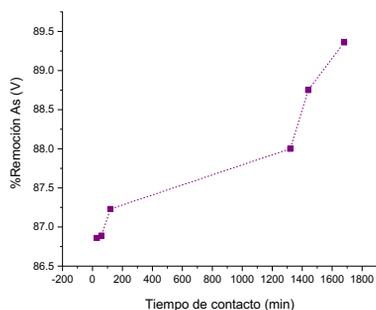
La figura 10 (derecha) muestra la gráfica de porcentaje de remoción en función a la masa de adsorbente, mediante la cual se obtuvo una relación directamente proporcional, donde el incremento de la masa de adsorbente, en nuestro caso, masa de compósito, generaba un aumento en los valores de la eficiencia de remoción. Además, se pudo notar que añadiendo desde 1,5 mg de adsorbente, los valores de porcentaje de remoción eran mayores al 80 %, indicando una alta remoción del metal. Por otra parte, fue posible observar que los valores de porcentajes de remoción obtenidos para 10,9; 15,6 y 22,1 mg fueron muy similares.



**Figura 10.** Gráfica de porcentaje de remoción en función a pH (izquierda) y masa de adsorbente (derecha).

### Efecto de tiempo de contacto

La figura 11 muestra la gráfica de porcentaje de remoción en función al tiempo de contacto. Podemos observar que a medida que aumenta el tiempo de contacto, hay un incremento en la eficiencia de remoción. Sin embargo, la diferencia entre los valores de remoción obtenidos (tabla 1) no es muy marcada, por lo cual podríamos elegir, en base a lo obtenido, un tiempo de 2 h y el material nos estaría dando resultados eficientes.



**Figura 11.** Gráfica de porcentaje de remoción en función al tiempo de contacto.

**Tabla 1.** Porcentaje de remoción de As(V) bajo diferentes tiempos de contacto.

Tiempo de contacto (min)	% Remoción de As(V)
30	86,86
60	86,89
120	87,23
1320	88,00
1440	88,75
1680	89,36

## CONCLUSIONES

La magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), hidroxiapatita (HAp) y los compósitos ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{HAp}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}/\text{HAp}$ ) fueron sintetizados y caracterizados mediante las técnicas de: DLS, VSM, SEM, FTIR, Raman y técnicas voltamperométricas. Se realizaron pruebas preliminares en la remoción de As(V) variando los parámetros de pH, masa de adsorbente y tiempo de contacto. Se obtuvo los valores máximos de porcentaje de remoción de este metal (mayor a 85 %) a condiciones de pH 6, dosis de adsorbente de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  y un tiempo de contacto de 2 h, dándonos buenos indicios de hacer un estudio más amplio y con otros metales pesados.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Grupo de Investigación de Electroquímica Aplicada por brindar los equipamientos e instalaciones para la realización de los experimentos desarrollados y a la Oficina de Gestión de la Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería (OGI - UNI) por el financiamiento para la realización de la investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Londoño-Franco L, Londoño-Muñoz P, Muñoz-García F. Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotechnol Sector Agropecuario Agroind.* 2017; 14(2): 145-152.
2. Goswami A, Purkait M, Removal of fluoride from drinking water using nanomagnetite aggregated schwertmannite. *J Water Process Eng.* 2014; 1: 91-100.
3. Rafiee E, Eavani S.  $H_3PW_{12}O_{40}$  supported on silica-encapsulated  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles: a novel magnetically-recoverable catalyst for three-component Mannich-type reactions in water. *Green Chem.* 2011; 13:2116-2122.
4. Khedr MG. Nanofiltration and low energy reverse osmosis for rejection of radioactive isotopes and heavy metal cations from drinking water sources. *Desalin Water Treat.* 2009; 2: 342-350.
5. Tejada-Tovar C, Villabona-Ortiz Á, Garcés-Jaraba Luz. Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecnológicas.* 2015; 18(34): 109-123.
6. Iwahori K, Watanabe J, Tani Y, Seyama H, Miyata N. Removal of heavy metal cations by biogenic magnetite nanoparticles produced in Fe(III)-reducing microbial enrichment cultures. *J Biosci Bioeng.* 2014;117(3):333-335.
7. Pan J, Wan D, Bian Y, Sun H, Zhang C, Jin F, et al. Fluorescent Hydroxyapatite-Loaded Biodegradable Polymer Nanoparticles with Folate Decoration for Targeted Imaging. *Aiche J.* 2013; 59: 4494-4501.
8. Zhang C, Li C, Huang S, Hou Z, Cheng Z, Yang P, *et. al.* Self-activated luminescent and mesoporous strontium hydroxyapatite nanorods for drug delivery. *Biomaterials.* 2010; 31: 3374-3383.
9. Szczeń A, Holysz L, Chibowski E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017; 249:321-330.
10. Coreño AJ, Mújica CJM, Hernández CD, Herrera GAM, García SJ. Evaluación de hidroxiapatita nanoparticulada como material adsorbente de iones flúor, plomo y arsénico en soluciones acuosas. *Superficies y Vacío.* 2010; 23: 161-165.
11. Janovák L, Deák A, Tallósy SP, Sebok D, Csapó E, Bohinc K, et al. Hydroxyapatite-enhanced structural, photocatalytic and antibacterial properties of photoreactive  $TiO_2$ /HAp/polyacrylate hybrid thin films. *Surf Coat Tech.* 2017; 326: 316-326.
12. Zhu Y, Quan X, Chen F, Fan X, Feng Y.  $CeO_2\text{-}TiO_2$  Coated Ceramic Membrane with Catalytic Ozonation Capability for Treatment of Tetracycline in Drinking Water. *Sci Adv Mater.* 2012; 4(12): 1191-1199.
13. López F, Alguacil F, Álvarez T, Cerpa A. Utilización de nanotubos de carbono para la eliminación de metales tóxicos en agua. [Internet] Madrid-España: Congreso Nacional del Medio Ambiente; 2014. [Citado 14 jul 2019]. Disponible en: <http://www.conama11.vsf.es/conama10/download/files/conama2014/CT%202014/1896711012.pdf>
14. Sequeda L, Díaz J, Gutiérrez S, Perdomo S, Gómez O. Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Rev Colomb Cienc Quim Farm.* 2012; 41(1): 50-66.

15. Rivera JA, Fetter G, Bosch P. Efecto del pH en la síntesis de hidroxiapatita en presencia de microondas. *Matéria*. 2011; 15(4): 506-515.
16. Jin X, Zhuang J, Zhang Z, Guo H, Tan J. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanorods in the presence of sodium citrate and its aqueous colloidal stability evaluation in neutral pH. *J Colloid Interface Sci*. 2015; 443:125-130.
17. Iwasaki T, Nakatsuka R, Murase K, Takata H, Nakamura H, Watano S. Simple and rapid synthesis of magnetite/hydroxyapatite composites for hyperthermia treatments via a mechanochemical route. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5): 9365-78.
18. Giraldo L, Erto A, Moreno-Pirajan JC. Magnetite nanoparticles for removal of heavy metals from aqueous solutions: synthesis and characterization. *Adsorption*. 2013; 19(2-4): 465-474.
19. Li YS, Church JS, Woodhead AL. Infrared and Raman spectroscopic studies on iron oxide magnetic nano-particles and their surface modifications. *J Magn Magn Mater*. 2012; 324:1543–1550.
20. Koutsopoulos S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *J Biomed Mater Res*. 2002; 62(4):600-612.
21. Martínez C, Aguilera E, Martínez A. Remoción de arsénico de agua potable mediante adsorción sobre óxido y oxihidróxidos de hierro. *Ciencia Cierta*. 2018; 56: 1-14.

## PRETRATAMIENTO E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CASCARILLA DE ARROZ

Yasmin Castillo García<sup>1</sup>, Juan Juscamaita Morales<sup>1</sup>, Paola A. Jorge Montalvo<sup>2,3</sup>, Lizardo Visitación Figueroa<sup>2,3</sup>

### RESUMEN

El presente estudio evaluó la hidrólisis de la cascarilla de arroz, mediante el pretratamiento alcalino-peróxido, ácido-peróxido y silicato-peróxido, seguido de hidrólisis enzimática utilizando celulasas, con alto nivel de  $\beta$ -glucosidasas y hemicelulasas. Los pretratamientos fueron realizados variando las concentraciones del medio alcalino (0, 2, 4 y 6 % *p/v*), ácido (0, 5, 10 y 15 % *v/v*) y silicato (0, 5, 10 y 15 % *p/v*) en concentraciones variables de peróxido (0, 5, 10 y 15 % *v/v*). La hidrólisis enzimática fue realizada a 50 °C, pH de 5, 72 h, 0,3 mL de enzima por g de cascarilla y con una carga del 5 % *p/v*. La caracterización morfológica de la superficie de la cascarilla de arroz mediante el SEM presentó una mayor transformación en medio alcalino-peróxido. La concentración de azúcares reductores después del pretratamiento alcalino-peróxido (6 % *p/v* KOH – 15 % *v/v* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH de 11, 70 °C, 3 h y con una carga del 10 % *p/v*) y de una hidrólisis enzimática (50 °C, pH de 5, 72 h, 0,3 mL/g; con una carga del 5 % *p/v*) alcanzó una sacarificación de hasta 73,2 %. Los azúcares reductores liberados podrían ser fermentados en el proceso de obtención de etanol 2G.

**Palabras clave:** cascarilla de arroz; pretratamiento; hidrólisis enzimática.

## PRE-TREATMENT AND ENZYMATIC SACRIFICATION OF RICE HUSK

### ABSTRACT

The present study evaluated the hydrolysis of rice husk, by means of alkaline peroxide, acid peroxide and silicate peroxide pretreatment, followed by enzymatic hydrolysis using cellulases, with a high level of  $\beta$ -glucosidasas and hemicellulases. Pretreatments were performed by varying the concentrations of the alkaline medium (0, 2, 4 and 6 % *p/v*), acid (0, 5, 10 and 15 % *v/v*) and silicates (0, 5, 10 and 15 % *v/v*) in varying concentrations of

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Ambiental - Unidad de Biorremediación – Facultad de Ciencias - Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Perú

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental CIQTOBIA – Facultad de Ciencias– Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Perú

<sup>3</sup> Centro Modelo de Tratamiento de Residuos CEMTRAR - Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima -Perú  
paolajom@lamolina.edu.pe

peroxide (0, 5, 10 and 15 % v/v). Enzymatic hydrolysis was performed at 50 °C, pH 5, 72 h, 0.3 mL of enzyme per g of husk, with a load of 5 % w/v. The morphological characterization of the surface of the rice husk by means of the SEM presented a greater transformation in alkaline-peroxide medium. The concentration of reducing sugars after the alkaline peroxide pretreatment (6 % KOH – 15 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 11, 70 °C, 3 h and with a load 10 % p/v) and the enzymatic hydrolysis (50 °C, pH 5, 72 h, 0.3 mL/g, with a load of 5% w/v) reached a saccharification of up to 73.2 %. The released reducing sugars could be fermented in the process of obtaining 2G ethanol.

**Key words:** rice husk; pretreatment; enzymatic hydrolysis.

## INTRODUCCIÓN

En el Perú, la producción de arroz, según el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ocupó un área sembrada y cosechada de 0,38 millones de hectáreas durante el 2014, estimando una generación aproximada de 0,34 millones de toneladas de cascarilla de arroz<sup>1</sup>.

La valorización de la cascarilla de arroz, residuo lignocelulósico, debe superar barreras naturales como la cercanía física y asociación química entre la lignina y los polisacáridos de la pared celular; así como el grado de cristalización de los polímeros de celulosa<sup>2,3,4</sup>, y para ello se debe realizar pretratamientos químicos, con al finalidad de exponer a la celulosa al ataque enzimático y posterior fermentación alcohólica para la obtención de la producción de etano de segunda generación<sup>5,6</sup>.

El pretratamiento alcalino-peróxido es aplicado para la remoción de la lignina por saponificación de los enlaces éster, logrando en algunos casos hasta un 50 % de remoción<sup>7,8</sup>. La inclusión del peróxido en medio alcalino favorece la delignificación por la oxidación con radicales hidroxilo y superóxidos<sup>9,10</sup>. El pretratamiento ácido permite la disolución de la hemicelulosa y redistribución de la lignina, aumentando la digestibilidad de la celulosa<sup>6</sup>. El efecto de altas temperaturas y elevada acidez pueden degradar las pentosas y hexosas formando furfural y 5-hidroximetilfurfural compuestos inhibidores de la hidrólisis enzimática y fermentación<sup>8,11</sup>. La aplicación del pretratamiento silicato-peróxido busca promover la formación de enlaces entre los grupos silicatos de la superficie rugosa y tricomas de la superficie de la cascarilla de arroz con los silicatos proporcionados por el pretratamiento generando huecos en la epidermis que expongan a la celulosa a un ataque enzimático posterior<sup>2</sup>.

Posterior al pretratamiento de la cascarilla de arroz, se realiza la hidrólisis enzimática, mediante una mezcla de enzimas que constan principalmente de celulasas, β-glucosidasas y hemicelulasas de tipo xilanasas<sup>12,13</sup>. Como una medida de la eficiencia de la hidrólisis, se utiliza el parámetro de la sacarificación, que relaciona el contenido de los azúcares reductores en el hidrolizado con el contenido de azúcares totales en la cascarilla de arroz<sup>12,14,15,16</sup>.

La presente investigación tuvo por objetivo evaluar el efecto de los pretratamientos químicos sobre la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales

La cascarilla de arroz fue recolectada en la Asociación Peruana de Molineros de Arroz y Molino Sudamérica en mayo del 2017 Lambayeque - Perú. El material presentó un tamaño de 9,2 – 10,7 mm de largo por 2,1 – 3,8 mm de ancho, para evitar un gasto energético adicional se eliminó el proceso de molienda, otros autores reportan que al utilizar la cascarilla molida hasta 1,2 mm, se favorece notoriamente la liberación de azúcares totales<sup>17</sup>. Las muestras fueron conservadas al vacío en bolsas de 5 kg de capacidad y almacenadas en oscuridad hasta su análisis.

Los reactivos utilizados para los pretratamientos fueron: hidróxido de potasio (85 %, Merck, Alemania), ácido acético glacial (100 %, Merck, Alemania), peróxido de hidrógeno (50 %, Maquimsa S.A., Perú), silicato de potasio (23 % SiO<sub>2</sub>, Klaida, Perú). Para la hidrólisis enzimática se utilizó una mezcla de celulasas, con alto nivel de β-glucosidasas y hemicelulasas (Cellic® CTec2).

### Pretratamiento de la cascarilla de arroz

Se realizaron nueve pretratamientos alcalino-peróxido utilizando mezclas (1:1) de hidróxido de potasio al 2, 4 y 6 % *p/v* y peróxido de hidrógeno al 5, 10, 15 % *v/v*; nueve pretratamientos ácido-peróxido utilizando mezclas (1:1) de ácido acético glacial al 5, 10 y 15 % *v/v* y peróxido de hidrógeno al 5, 10 y 15 % *v/v*; y nueve pretratamientos silicato-peróxido utilizando mezclas (5:2) de silicato de potasio al 5, 10 y 15 % *p/v* y peróxido de hidrógeno al 5, 10, 15 % *v/v*, como se observa en tabla 1.

**Tabla 1.** Pretratamientos aplicados a la cascarilla de arroz.

Pretratamientos					
Alcalino-peróxido		Ácido-peróxido		Silicato-peróxido	
% KOH - % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		% CH <sub>3</sub> COOH - % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		% K <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> - % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
T1-Alc	0 – 0	T1-Ac	0 – 0	T1-S	0 – 0
T2-Alc	2 – 5	T2-Ac	5 – 5	T2-S	5 – 5
T3-Alc	4 – 5	T3-Ac	10 – 5	T3-S	10 – 5
T4-Alc	6 – 5	T4-Ac	15 – 5	T4-S	15 – 5
T5-Alc	2 – 10	T5-Ac	5 – 10	T5-S	5 – 10
T6-Alc	4 – 10	T6-Ac	10 – 10	T6-S	10 – 10
T7-Alc	6 – 10	T7-Ac	15 – 10	T7-S	15 – 10
T8-Alc	2 – 15	T8-Ac	5 – 15	T8-S	5 – 15
T9-Alc	4 – 15	T9-Ac	10 – 15	T9-S	10 – 15
T10-Alc	6 – 15	T10-Ac	15 – 15	T10-S	15 – 15

Se utilizó una carga de 10 % p/v de cascarilla de arroz en la solución deslignificante de cada pretratamiento, el tiempo de incubación fue de 3 h a 70 °C<sup>18</sup>. Se seleccionó un pretratamiento óptimo de cada solución deslignificante (alcalino-peróxido, ácido-peróxido, silicato-peróxido) en base a la mayor concentración de azúcares totales en el lixiviado, para su caracterización morfológica mediante SEM e hidrólisis enzimática.

### **Determinación de azúcares totales (AT)**

La determinación de AT se realizó en el lixiviado de las muestras como una medida indirecta de la eficiencia de cada pretratamiento. Se utilizó el método de DuBois, que se basa en la deshidratación de los azúcares al reaccionar con el ácido sulfúrico formando derivados de furfural. La formación del complejo coloreado se encuentra entre amarillo y naranja y presenta una absorbancia máxima a 490 nm<sup>19</sup>. Para la cuantificación se utilizó un espectrofotómetro modelo Evolution 300 UV-Vis Thermo Fisher Scientific.

### **Caracterización morfológica de la cascarilla de arroz pretratada**

Las muestras de los pretratamientos óptimos y una muestra no pretratada fueron observadas por la parte interna y externa de su superficie utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio electrónico modelo Q250 Analytical. Para el análisis las muestras fueron secadas y cubiertas con una película de oro, se utilizó una aceleración de voltaje de 20 kV. Las imágenes fueron obtenidas a 35 y 260 magnificaciones.

### **Hidrólisis enzimática (HE)**

La cascarilla de arroz pretratada fue hidrolizada enzimáticamente con diferentes relaciones enzima/sustrato: 0,1; 0,2 y 0,3 mL de enzima por gramo de sustrato, similar a lo reportado por Salcedo *et al.*<sup>20</sup>; utilizando una carga de 5 % p/v, 50 mM de buffer acetato de sodio, pH de 5, a 50° C por 72 horas y agitación de 150 rpm. Se trabajó con una mezcla de enzimas: celulasas, con alto nivel de  $\beta$ -glucosidasas y hemicelulasas (Cellic® CTec2). Este mezcla de enzimas posee un alto rendimiento de conversión, efectiva a altas concentraciones de sólidos, tolerante a inhibidores, compatible con múltiples materias primas y pretratamientos, posee una alta concentración y estabilidad<sup>13</sup>. Al finalizar, se almacenó el hidrolizado enzimático a 4 °C para determinar la cantidad de azúcares reductores así como el porcentaje de sacarificación.

### **Determinación de azúcares reductores (AR) y sacarificación**

La determinación de AR fue realizada utilizando el método del DNS, el método se basa en la reacción redox que ocurre entre los azúcares reductores y el ácido 3,5-dinitrosalicílico, la cual produce una coloración naranja y presenta una absorbancia máxima a 540 nm<sup>21,22</sup>. Para la cuantificación se utilizó un espectrofotómetro modelo Evolution 300 UV-Vis Thermo Fisher Scientific.

La sacarificación es un parámetro importante para evaluar la capacidad de un sustrato para formar azúcares reductores. Este parámetro relaciona el contenido de azúcares reductores en el hidrolizado enzimáticos y la concentración potencial de azúcar del sustrato con o sin pretratamiento, se determina mediante la ecuación (1)<sup>7,15,23</sup>.

$$\% \text{Sacarificación} = \frac{\text{Conc. de azúcares reductores en el hidrolizado enzimático}}{\text{Conc. potencial de azúcar del sustrato}} \times 100 \quad (1)$$

La concentración potencial de azúcares en la cascarilla de arroz se basó en la determinación del contenido de celulosa y hemicelulosa, obtenida por diferencia entre la masa total y el contenido de lignina, humedad y cenizas, conforme a lo establecido por el reporte técnico de la National Renewable Energy Laboratory OF United States NREL/TP-510-42618.

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron usando el software estadístico xlstat versión 2018.1. Se realizaron pruebas estadísticas de ANOVA y el LSD-Fisher.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pretratamiento de la cascarilla de arroz

Los resultados óptimos para cada pretratamiento fueron: T10-Alc, T9-Ac y T10-S. El análisis estadístico del ANOVA y el LSD-Fisher presentan diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en cada caso. En la figura 1 se muestra la comparación de AT en mg/g.

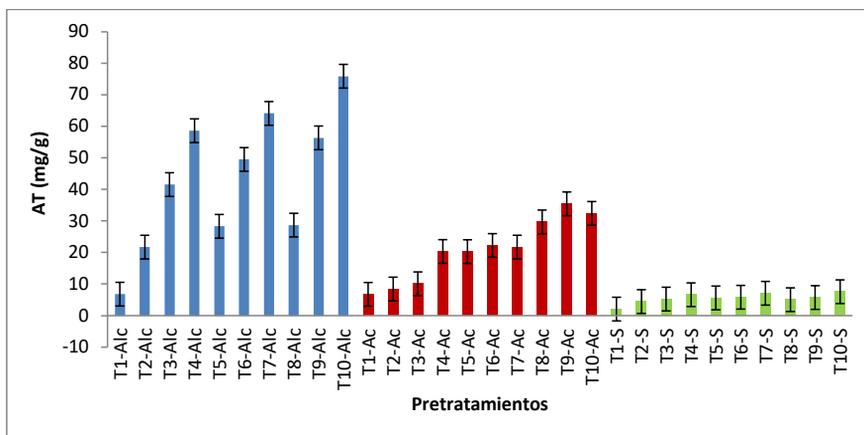


Figura 1. Azúcares totales (mg/g) en el lixiviado de la cascarilla de arroz sometida a pretratamientos.

El pretratamiento es la etapa más importante, pues tiene un impacto en el rendimiento y eficiencia de la hidrólisis enzimática. En esta etapa se eliminan algunos componentes constitutivos de la cascarilla como la lignina que dificulta la actividad enzimática y disminuye la cristalinidad de las fibras de celulosa; también se remueve la hemicelulosa de los residuos lignocelulósicos<sup>5,6</sup>.

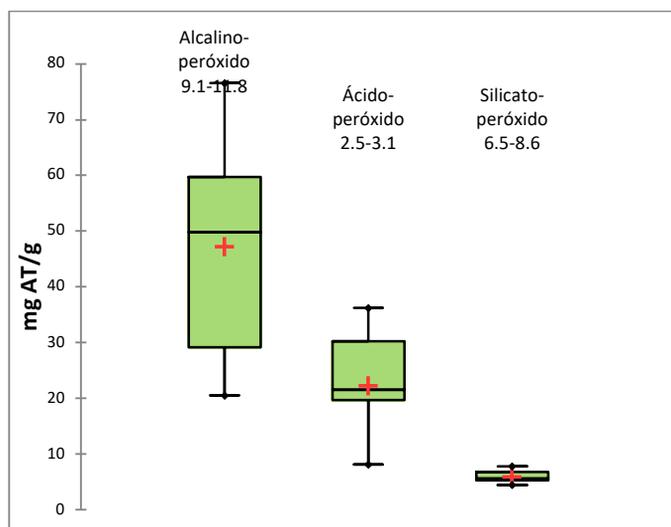
El pretratamiento T10-Alc ( $\text{H}_2\text{O}_2$  15 % v/v, pH de 11, 70 °C y 3 h de incubación para 10% de sustrato) de la cascarilla de arroz presentó el mejor resultado liberando hasta 75,9 mg/g de azúcares totales, este resultado es mayor al encontrado para el tratamiento alcalino 60 mg/g ( $\text{H}_2\text{O}_2$  0% v/v, pH de 11,5, 35 °C y 24 horas de incubación para 15 % de sustrato) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 45 °C, 72 h, 0,4 mL/g) y menor que el tratamiento con alcalino-peróxido 249 mg/g ( $\text{H}_2\text{O}_2$  7,5 % v/v, pH de 11,5, 35 °C, 24 horas de incubación para 15 % de sustrato) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 45 °C, 72 h, 0,4 mL/g) reportado por Saha y Cotta<sup>17</sup>. A tiempos cortos de pretratamiento, temperaturas altas de incubación mejoran el rendimiento de los azúcares liberados similar a lo reportado por Saha y Cotta<sup>17</sup> cuando evalúa a las temperaturas de 25 y 35 °C obteniendo un resultado de 149 y 211 mg/g, respectivamente. El incremento de la dosis de álcali mejora la liberación de azúcares totales desde 28,7 (T8-Alc) hasta 75,9 mg/g (T10-Alc) similar a lo reportado por Saha y Cotta<sup>25</sup>, que logra un incremento hasta del 83 %, cuando utiliza piedra caliza como álcali. Asimismo, se reporta que mediante el pretratamiento alcalino se mejora la digestibilidad de la celulosa y una menor degradabilidad de azúcares en relación al pretratamiento ácido<sup>25,26</sup>. Mediante el pretratamiento alcalino se produce la saponificación de los enlaces éster de la lignina, provocando la hidrólisis de la lignina, hemicelulosa y celulosa<sup>8</sup> evita la fragmentación de los polímeros de hemicelulosa, remueve lignina y hemicelulosa aumentando la accesibilidad de las enzimas a la celulosa<sup>6,8,27</sup>, sin degradar tanto los azúcares<sup>27</sup>, es por ello que es más eficiente que los otros pretratamientos. Aunque este pretratamiento presenta como desventaja que algunas bases se conviertan en sales y estas se incorporan en la biomasa<sup>27</sup>. Se reporta que el pretratamiento alcalino-peróxido es más eficaz para mejorar la digestibilidad de los residuos en la hidrólisis enzimática, es decir, se obtiene mayor solubilidad de lignina y hemicelulosa, y una mayor conversión a pH de 11,5; en comparación del pretratamiento alcalino<sup>26,28</sup>.

El pretratamiento T9-Ac ( $\text{H}_2\text{O}_2$  15 % v/v, pH de 2,6, 70 °C y 3 h de incubación para 10% de sustrato) liberó hasta 35,5 mg/g de azúcares totales, este resultado es mayor a 15 mg/g ( $\text{H}_2\text{O}_2$  0% v/v, pH menor a 2, 121 °C, 15 min de incubación para 15 % de sustrato) reportado por Saha et al.<sup>11</sup>, pero inferior a 65 mg/g determinado por Wi et al.<sup>29</sup> al utilizar ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{O}_2$  0% v/v, pH menor a 2, 80 °C, 120 min de incubación para 10 % de sustrato) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 37 °C, 72 horas de incubación, actividad de la celulasa y xilanasas de 79 kFPU/mL y 592 IU/mL). El pretratamiento con ácido depende de la temperatura, tiempo, concentración y tipo de ácido utilizado para la obtención de azúcares fermentables<sup>6,27</sup>. Este pretratamiento no resulta efectivo para la eliminación de la lignina, siendo tóxico, corrosivo y peligroso, requiriendo de procesos resistentes a la corrosión, lo que provoca un encarecimiento de costes<sup>26,28</sup>. Se reporta que durante el pretratamiento ácido caliente, generalmente las hemicelulosas se hidrolizan<sup>8,26</sup> y los azúcares libres resultantes pueden degradarse a furfural provenientes de pentosas y a 5-hidroxi-metilfurfural provenientes de hexosas<sup>8</sup>. Estos compuestos son inhibidores de los microorganismos, y su producción significa la pérdida de azúcares fermentables<sup>8,26</sup>. Estudios realizados por Wi *et al.*<sup>29</sup> en paja de arroz (relación de 1:1 de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 80 °C y 2 h de incubación, para 10 % de sustrato) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 37 °C, 72 h, actividad de la celulasa y xilanasas de 79 kFPU/mL y 592 IU/mL) lograron mejores resultados de hasta 110 mg/g de azúcares totales, debido a que el pretratamiento con ácido acético y peróxido de hidrógeno es más eficiente para eliminar

lignina antes de la hidrólisis enzimática<sup>8,29</sup>, además no requiere de elevadas temperaturas, es menos corrosivo como los ácidos fuertes y disminuye la generación de inhibidores en el proceso de la fermentación.

El pretratamiento T10-S ( $H_2O_2$  15% v/v, pH neutro, 70 °C y 3 h de incubación para 10% de sustrato) liberó hasta 7,6 mg/g de azúcares totales, este resultado es menor a cualquiera de los pretratamientos probados alcalino-peróxido o ácido-peróxido, también es menor a 15,0 mg/g reportado por Wi *et al.*<sup>29</sup> cuando solo se aplica una molienda como pretratamiento, sin la aplicación de otros reactivos, e hidrólisis enzimática (pH de 5, 37 °C, 72h, actividad de la celulasa y xilanasas de 79 kFPU/mL y 592 IU/mL).

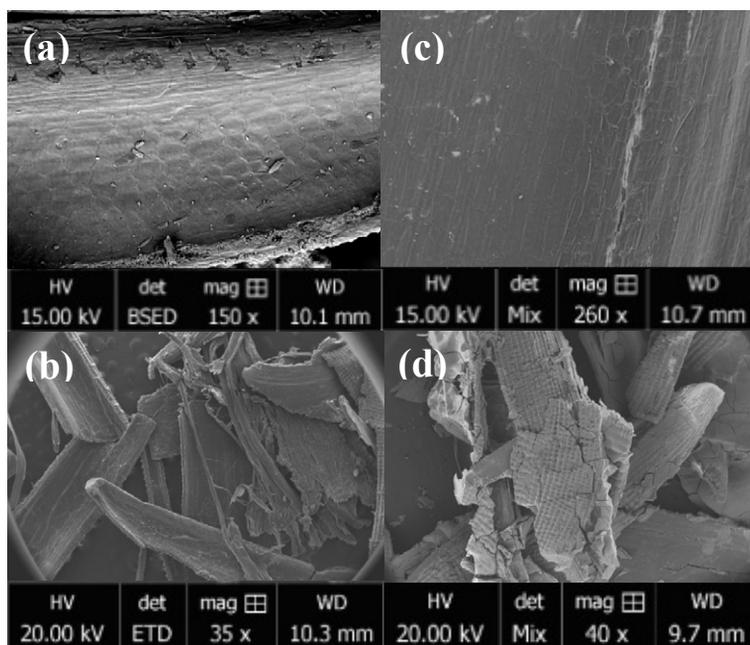
En la figura 2 se observa el rango de valores de pH encontrados en los lixiviados de los pretratamientos de la cascarilla de arroz, estos fueron; alcalino-peróxido: 9,1-11,8, ácido-peróxido: 2,5-3,1 y silicato-peróxido: 6,6-8,6. Los valores de pH hallados en el pretratamiento alcalino-peróxido se asemejan a los valores reportados, en donde se indica que la eficiencia de la deslignificación está en relación a los valores de pH, valores de 11,5-11,6 son más efectivos y valores menores a 10 son insignificantes y valores de más de 12,5 no muestran efecto sobre la digestibilidad enzimática<sup>17,26,30</sup>. El control del valor de pH entre 4 y 7 puede mejorar la susceptibilidad de la celulosa a las enzimas, disminuye la cristalinidad de la celulosa, disminuye la asociación de la celulosa con la lignina y evita la formación de la degradación de los monosacáridos a furfurales e hidroximetilfurfurales que interfieren en el proceso de hidrólisis enzimática y en el proceso fermentativo<sup>31</sup>.



**Figura 2.** Relación entre de azúcares totales en el lixiviado en mg/g y pH según los pretratamientos.

### Caracterización morfológica de la cascarilla de arroz

El análisis por microscopía de barrido electrónico de la epidermis interna de la cascarilla de arroz sin pretatratamiento presentó una superficie lisa, cerosa y brillante, acorde con lo planteado por Zou y Yang<sup>2</sup>, donde la lignina y la hemicelulosa mantienen unidas a las fibras de celulosa (figura 3a); el pretratamiento con T10-Alc presentó una superficie muy rasgada con parcial desintegración de la fibra debido a la remoción de la lignina y la hemicelulosa similar a lo reportado por Brígida *et al.*<sup>24</sup> (figura 3b), el pretratamiento con T9-Ac presentó una superficie rasgada, donde se ha removido la capa cerosa de ácidos grasos y se observa la formación de fosas donde se ha removido la pared celular (figura 3c), en el pretratamiento T10-S se observó que el silicato proveniente de la solución del pretratamiento forma una película sobre la superficie de la cascarilla de arroz que evita el ataque del peróxido sobre la fibra (figura 3d).

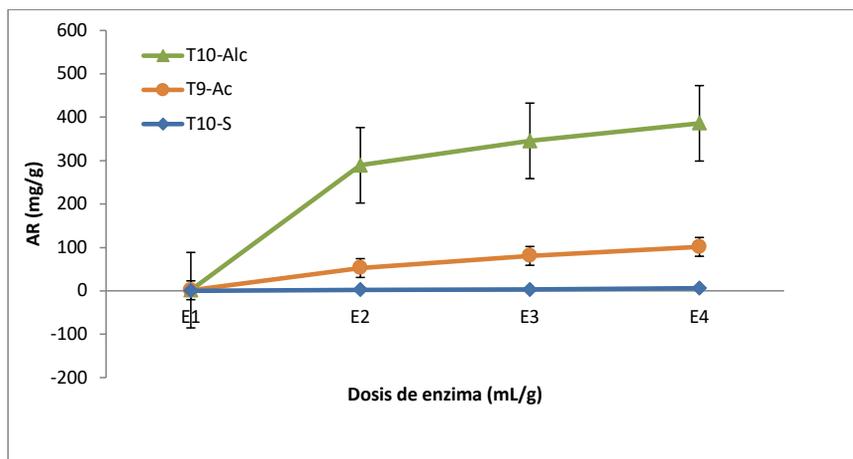


**Figura 3.** Microscopía de barrido electrónico (SEM) de la cascarilla de arroz, sin pretratamiento (a), con pretratamiento T10-Alc(b), T9-Ac(c) y T10-S(d).

### Hidrólisis enzimática

Los sustratos obtenidos de los pretratamiento seleccionados, T10-Alc, T9-Ac y T10-S fueron hidrolizados enzimáticamente con 0, 0,1, 0,2 y 0,3 mL de enzima Cellic Ctec2 por gramo de cascarilla de arroz, utilizando buffer acetato de sodio 50 mM, pH de 5, 50° C y 72 h de hidrólisis. En la figura 4 se observa que la mayor concentración de azúcares reductores a las 72 h de hidrólisis, se logra cuando se trabajó con la cascarilla proveniente del pretratamiento T10-Alc (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 % v/v, pH de 11, 70 °C y 3 h de incubación para 10 % de sustrato).

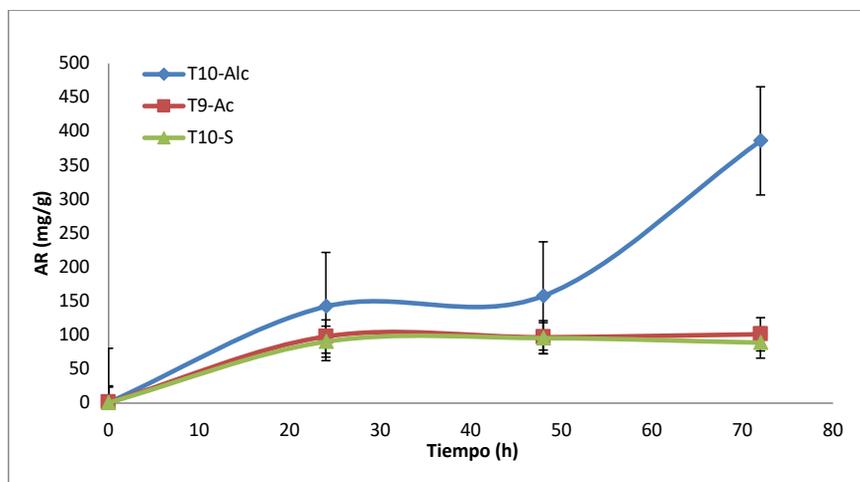
Mediante las comparaciones múltiples de LSD-Fisher se analizó los tratamientos enzimáticos que provenían de los pretratamientos T10-Alc, T9-Ac y T10-S, presentando diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) solo para el pretratamiento alcalino-peróxido en relación a los otros tratamientos.



**Figura 4.** Azúcares reductores (mg/g) en la hidrólisis enzimática (dosis de enzima E1: 0, E2: 0,1, E3: 0,2 y E4: 0,3 mL/g Ctec2, 50 mM de buffer acetato de sodio, pH de 5, 50 °C por 72 h, carga 5 % p/v) de los pretratamientos T10-Alc ( $\text{H}_2\text{O}_2$  15 % v/v, pH de 11, 70 °C por 3 h, carga 10 % p/v), T9-Ac ( $\text{H}_2\text{O}_2$  15 % v/v, pH de 2,6, 70 °C por 3 h, carga 10 % p/v) y T10-S ( $\text{H}_2\text{O}_2$  15 % v/v, pH 7,5, 70 °C por 3 h, carga 10 % p/v).

La concentración de azúcares reductores en mg/g proveniente del pretratamiento T10-Alc (6 % KOH – 15 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 70°C, 3 h y carga del 10 % p/v) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 50 °C por 72 h, 0,3 mL/g, con una carga 5% p/v) alcanza valores de 399,9 mg/g, este valor es superior a 60 mg/g cuando se trabajó con pretratamiento alcalino (0% v/v  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pH de 11,5, 35 °C por 24 h) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 45 °C por 72 h, 0,4 mL/g, con una carga 5 % p/v) y de 260 mg/g de azúcares reductores cuando se trabajó con pretratamiento peróxido alcalino (7,5 % v/v  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pH de 11,5, 35 °C por 24 h) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 45 °C por 72 h, 0,4 mL/g, con una carga 5 % p/v) reportado por Saha y Cotta<sup>17</sup>. Se observa que en presencia del peróxido y alta temperatura en el pretratamiento se obtiene mayor cantidad de azúcares reductores, estas relaciones también lo reporta Saha y Cotta<sup>30</sup>.

En la figura 5 se observa mayor concentración de azúcares reductores a mayor tiempo de incubación de hidrólisis enzimática para el pretratamiento T10-Alc, semejante resultado reportó Saha y Cotta<sup>30</sup> al obtener un máximo rendimiento de azúcares, trabajando bajo las condiciones mencionadas anteriormente y con una dosis de 0,12 mL/g de enzima, variando los tiempos de incubación de 3 h a 120 h, obteniendo 190 mg/g y 353 mg/g de AR, respectivamente; aún así, estos valores reportados no llegan a superar el valor hallado en el presente trabajo de 399,88 mg/g, teniendo como desventaja el largo tiempo de incubación pero eficientes al usar una menor concentración de enzima.



**Figura 5.** Promedio de azúcares reductores y el tiempo de incubación en la hidrólisis enzimática (pH de 5, 45 °C, 0,3 mL/g Ctec2 con una carga 5 % p/v) con los pretratamientos T10-Alc, T9-Ac y T10-S.

### Porcentaje de sacarificación

Para obtener el porcentaje de sacarificación se aplicó la Ec. (1), que relaciona el contenido de azúcares reductores en el hidrolizado enzimáticos y la concentración potencial de azúcar del sustrato con o sin pretratamiento. El contenido potencial de azúcares (celulosa y hemicelulosa) en la cascarilla de arroz fue de 54,75 % valor similar a lo reportado por Yu *et al.*<sup>23</sup>, este valor se obtuvo de la diferencia entre la masa total y el contenido de lignina 18,02 %, la humedad 8,78 % y cenizas 18,45 %, como se observa en la tabla 2.

**Tabla 2.** Composición química de la cascarilla de arroz.

Componente	Contenido (%)
Lignina	18,02 ± 0,87
Humedad	8,78 ± 0,41
Cenizas	18,45 ± 0,38
Celulosa+ Hemicelulosa	54,75 ± 0,01

Nota: Resultados ± desviación estándar para dos muestras por triplicado

Los mejores resultados encontrados fue para el pretratamiento T10-Alc (6% KOH - 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 70°C, 3 h y carga del 10 % p/v) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 50 °C por 72 h, 0,3 mL/g, con una carga 5 % p/v) que alcanzó una sacarificación de 73,2 %, este resultado es similar a 73 % reportado por Saha y Cotta<sup>17</sup> (7,50 % v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH de 11,5, 35 °C; 24 h, con carga de 15 % p/v), e hidrólisis enzimática (pH de 5, 45 °C, 72 h, 0,12 mL/g y carga de 10 %

p/v), utilizando una mezcla de enzimas celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y xylanasa, cuando se utiliza cascarilla de arroz como sustrato.

## CONCLUSIONES

El pretratamiento alcalino-peróxido, tiene mayor efecto en el acceso de las enzimas celulasas,  $\beta$ -glucosidasas y xilanasas en la cascarilla de arroz facilitando la sacarificación de la celulosa y hemicelulosa, en azúcares reductores que podrían ser fermentados en el proceso de obtención de etanol 2G. Sin embargo, el uso de diversos medios puede tener un impacto en el gasto energético del proceso.

## AGRADECIMIENTO

Se agradece al Programa Nacional de Innovación Agraria – PNIA, Fondo Concursable Investigación Estratégica Priorizada del concurso N° 2-IE-PNIA-2016, patrocinadores del Proyecto Producción de etanol de 2da. generación G-2 a partir de residuos agroindustriales de caña, arroz y maíz, por su apoyo en el desarrollo de la presente investigación. Laboratorio de Biotecnología Ambiental - Unidad de Biorremediación, Centro Modelo de Tratamiento de Residuos CEMTRAR y el Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental CIQTOBIA de la Universidad Nacional Agraria La Molina UNALM, por el apoyo brindado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SIEA. Producción Agrícola y Ganadera 2015. [Internet] Lima: Ministerio de Agricultura y Riego; 2015. [consultado 12 jul 2019]. Disponible en: <http://siea.minagri.gob.pe/siea/?q=noticias/anuario-de-la-producci%C3%B3n-agr%C3%ADcola-y-ganadera-2015>
2. Patel MM, Bhatt RM. Optimisation of the Alkaline Peroxide Pretreatment for the Delignification of Rice Straw and its Applications. *J Chem Tech Biotechnol.* 1992; 53(3):253–263.
3. Dagnino EP, Felissia F, Chamorro E, Area M. Obtención de biotanol a partir de la celulosa presente en cascarilla de arroz y aserrín de algarrobo. *Av Energ Renov Medio Ambiente.* 2014;18: 06.01-06.07
4. González-Rentería SM, Soto-Cruz NO, Rutiaga-Quiñones OM, Medrano-Roldán H, Rutiaga-Quiñones JG, López-Miranda J. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades (Pinto villa, Pinto saltillo, Pinto mestizo y Flor de mayo). *Rev Mex Ing Química.* 2011; 10(1):17–28.
5. Zou Y, Yang T. Chapter 9 - Rice Husk, Rice Husk Ash and Their Applications. En: Cheong L-Z, Xu X, editores. *Rice Bran and Rice Bran Oil* [Internet]. AOCS Press; 2019. p. 207-246. [citado 7 de julio de 2019]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128128282000093>

6. Naveda R, Jorge P, Flores L, Visitación L. Remoción de lignina en el pretratamiento de cascarilla de arroz por explosión con vapor. *Rev Soc Quím Perú*. 2019; 85(3): 352-361.
7. Gould JM. Alkaline Peroxide Delignification of Agricultural Residues to Enhance Enzymatic Saccharification. *Biotechnol Bioeng*. 1984; 26:46–52.
8. Karp SG, Woiciechowski AL, Soccol VT, Soccol R. Pretreatment Strategies for Delignification of Sugarcane Bagasse: A Review. *Braz Arch Biol Technol* 2013; 56(4):679–689.
9. Gould JM. Studies on the Mechanism of Alkaline Peroxide Delignification of Agricultural Residues. *Biotechnol Bioeng*. 1985; 27(3):225-231.
10. Dutra ED, Santos FA, Ribeiro B, Alencar A, Libanio A, Reis S. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of lignocellulosic biomass: status and perspectives. *Biomass Convers Biorefinery*. 2017; 8(1):225–234.
11. Saha BC, Iten LB, Cotta MA, Wu YV. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. *Biotechnol Prog*. 2005; 21:816–822.
12. Qi B, Chen X, Shen F, Su Y, Wan Y. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw Pretreated by Alkaline Peroxide Using Response Surface Methodology. *Ind Eng Chem Res*. 2009; 48:7346–7353.
13. Novozymes. Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials. [Internet]. Novozymes [Consultado 20 jul 2019]. Disponible en: [https://www.yumpu.com/en/document/read/45797213/cellicar-ctec2-and-htec2-enzymes-for-hydrolysis-of-lignocellulosic-](https://www.yumpu.com/en/document/read/45797213/cellicar-ctec2-and-htec2-enzymes-for-hydrolysis-of-lignocellulosic)
14. Tewari HK, Marwaha SS. Evaluation of Acids and Cellulase Enzyme for the Effective Hydrolysis of Agricultural Lignocellulosic Residues. *J Chem Tech Biotechnol*. 1988; 41(4):261–275.
15. Sharma A, Khare SK, Gupta MN. Hydrolysis of rice hull by crosslinked *Aspergillus niger* cellulase. *Bioresour Technol*. 2001; 78(3):281–284.
16. Yamashita Y, Shono M, Sasaki C, Nakamura Y. Alkaline peroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of bamboo. *Carbohydr Polym*. 2010; 79(4):914–920.
17. Saha BC, Cotta MA. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. *Enzyme Microb Technol*. 2007; 41(4):528–532.
18. Song Y, Wi SG, Kim HM, Bae H. Cellulosic bioethanol production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) using hydrogen peroxide-acetic acid (HPAC) pretreatment. *Bioresour Technol*. 2016; 214:30-36.
19. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem*. 1956; 28(3):350–356.
20. Salcedo JG, López JE, Flórez LM. Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollo) de la cosecha de caña de azúcar. *DYNA*. 2011; 78:182–190.
21. Bello Gil D, Carrera Bocourt E, Díaz Maqueira Y. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA Sobre los Deriv la Caña Azúcar*. 2006; 40(2):45–50.
22. Fajardo Castillo E, Sarmiento Forero S. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. [Tesis de pregrado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.

23. Yu J, Zhang J, He J, Liu Z, Yu Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresour Technol.* 2009;100(2):903–908.
24. Brígida AIS, Calado VMA, Gonçalves LRB, Coelho MAZ. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. *Carbohydr Polym.* 2010; 79(4):832–838.
25. Saha BC, Cotta MA. Enzymatic hydrolysis and fermentation of lime pretreated wheat straw to ethanol. *J Chem Technol Biotechnol.* 2007; 82:913–919.
26. Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment , hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol.* 2010; 101(13):4744–4753.
27. Morales de la Rosa S. Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. [Tesis doctoral]. Madrid:Universidad Autónoma de Madrid; 2015.
28. Carvalheiro F, Duarte LC, Gírio FM. Hemicellulose biorefineries : a review on biomass pretreatments. *J Sci Ind Res.* 2008; 67:849–864.
29. Wi SG, Cho EJ, Lee DS, Lee SJ, Lee YJ, Bae HJ. Lignocellulose conversion for biofuel: a new pretreatment greatly improves downstream biocatalytic hydrolysis of various lignocellulosic materials. *Biotechnol Biofuels.* 2015; 8:1–11.
30. Saha BC, Cotta MA. Ethanol Production from Alkaline Peroxide Pretreated Enzymatically Saccharified Wheat Straw. *Biotechnol Prog.* 2006; 22(2):449–53.
31. Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuel Bioprod Biorefin.* 2008; 2(1):26–40.

## **PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE BIOCHAR A PARTIR DE RESIDUOS ORGÁNICOS AVÍCOLAS**

Enmer Trujillo A.<sup>a\*</sup>, Christian Eduardo Valencia A.<sup>a</sup>, María Cecilia Alegría A.<sup>a</sup>,  
Alejandrina Honorata Sotelo M.<sup>b</sup>, Mary Flor Césare C.<sup>a</sup>

### **RESUMEN**

Los sistemas avícolas intensivos generan residuos orgánicos (gallinaza y pollinaza), las cuales, al ser utilizadas frescas causan impactos negativos al ambiente, sin embargo, estos residuos orgánicos son ricos en nutrientes que pueden ser utilizados como enmiendas del suelo, siendo la producción de biochar una alternativa para su aprovechamiento. En esta investigación, la producción del biochar se efectuó con un horno pirolizador (5 kg de capacidad). Midiéndose en la etapa de producción los parámetros: temperatura, rendimientos y densidad del material resultante. Asimismo, se caracterizó tanto la materia prima (gallinaza y pollinaza) como el biochar obtenido, determinándose: pH, humedad, cenizas, carbono orgánico total y contenidos de los macro y micronutrientes. Al evaluar las propiedades del biochar se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre la pollinaza y gallinaza en rendimientos, densidad, pH, humedad, cenizas, nitrógeno, fósforo total, calcio, magnesio y hierro. El biochar fue sometido a pruebas de bioensayo para determinar el índice de crecimiento de las semillas y el crecimiento de los tallos de los primeros diez días. El índice de germinación del biochar de la gallinaza resultó significativo con el tratamiento del 3 % y como consecuencia la longitud de crecimiento de los tallos de las plántulas fue significativa.

**Palabras clave:** biochar, pirólisis, caracterización, residuos orgánicos avícolas.

## **PRODUCTION AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF BIOCHAR FROM ORGANIC AGRICULTURAL WASTE**

### **ABSTRACT**

The intensive poultry systems generate organic waste (poultry manure and poultry litter); which, when used fresh, cause negative impacts to the environment, however, these organic residues are rich in nutrients that can be used as soil amendments, being the biochar production an alternative for their use. In this investigation, the biochar production was carried out with

---

<sup>a</sup> Departamento Académico de Química. Facultad de Ciencias. UNALM Lima - Perú.

\* e-mail: perugreen@hotmail.it

<sup>b</sup> Departamento Académico de Nutrición. Facultad de Zootecnia UNALM Lima - Perú.

a pyrolyzing furnace (5 kg capacity). Measuring in the production stage the parameters: temperature, yields and density of the resulting material. Likewise, the raw material (chicken and poultry litter) and the biochar obtained were characterized, determining: pH, humidity, ash, total organic carbon and contents of the macro and micronutrients. When evaluating the properties of the biochar, statistically significant differences were obtained between the poultry litter and chicken manure in yields, density, pH, humidity, ash, nitrogen, total phosphorus, calcium, magnesium and iron. The biochar was subjected to bioassay tests to determine the growth rate of the seeds and the growth of the stems of the first ten days. The germination rate of the biochar of the chicken manure was significant with the treatment of 3% and as a consequence the length of growth of the stems of the seedlings was significant.

**Key words:** biochar, pyrolysis, characterization, poultry organic waste.

## INTRODUCCIÓN

El deterioro progresivo del medio ambiente es uno de los temas de mayor preocupación. El desarrollo y crecimiento económico y tecnológico de la sociedad han conllevado a un incremento exponencial de los residuos generados<sup>1</sup>, así la Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos (D.L 1278), indica que todos los residuos provenientes de procesos agro industriales sean valorizados al ser transformados en compost<sup>2</sup>, biochar, vióles u otros productos. Así, autores<sup>3</sup> definen al biochar o biocarbón como el producto obtenido de la descomposición térmica de materiales orgánicos con escaso o limitado suministro de oxígeno (pirólisis), a temperaturas inferiores a los 700°C, siendo este usado para fines agrícolas como mejorador del suelo, (retener agua y/o almacenar carbono) lo cual lo diferencia del carbón (combustible) y del carbón activado.

Dado que la industria avícola es una de las actividades que genera gran cantidad de residuos al final del periodo (Gallinaza: entre 20-28 kg/ave y la pollinaza: entre 1,5 y 2 kg por ave)<sup>4</sup>, cuya gestión inadecuada, podría contaminar el agua y el aire como fuente de proliferación y diseminación de plagas, enfermedades de importancia sanitaria humana y animal; además, contribuye el cambio climático y afecta los ecosistemas. Por ello, una gestión adecuada de estos residuos contribuye el ahorro de materias primas, la conservación de los recursos naturales y el desarrollo sostenible<sup>5</sup>.

Así, la producción de biochar de estos residuos permitirá cumplir la normativa vigente, al valorizarse como enmienda orgánica, lo que permitiría su posible uso en la restauración y recuperación de los suelos degradados, o simplemente la aplicación puntual en un suelo con unas características definidas y bajo unos objetivos de enmienda establecidos<sup>1</sup>. El empleo de biocarbón puede ser una posibilidad para contribuir a paliar la pérdida de fertilidad y la declinación de las propiedades químicas, físicas y biológicas de los suelos y particularmente la disminución de la materia orgánica; también como material de encalado ya que tienen los pH altos<sup>3</sup>.

Las propiedades del biochar están influenciadas por las condiciones de pirólisis como: la temperatura y tiempo de tratamiento, velocidad de calentamiento y características del horno<sup>6</sup>. También están influenciadas por las características de la materia prima como son el carbono total, el carbono fijo y los elementos minerales del biochar, mientras el área superficial del biochar y el pH están influenciados por los tratamientos a mayores o menores temperaturas<sup>7</sup>.

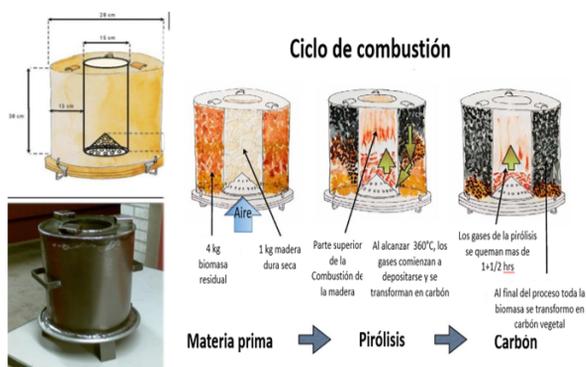
Por ello, la presente investigación tuvo como objetivos: producir biochar con residuos avícolas mediante la pirólisis lenta, caracterizar químicamente tanto la materia prima como el biochar obtenido, finalmente realizar ensayos toxicológicos para determinar la dosis adecuada de biochar a aplicar al suelo, mediante el test de crecimiento del *Raphanus sativus* L.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales y métodos

Los residuos avícolas (gallinaza y pollinaza) utilizados en la producción del biochar provienen de las granjas avícolas de la empresa San Fernando S.A. ubicados en el distrito de Huaral y Lurín. Se seleccionó granjas representativas de producción de gallinas ponedoras y de los pollos de engorde de la empresa en la zona costera del Perú. El horno pirolítico (equipo usado para la producción del biochar) fue diseñado y fabricado en base a la necesidad de producción del biochar necesarias para las muestras requeridas para la investigación.

Su diseño y su elaboración se muestran en la figura 1, se encuentra compuesto por dos componentes. Un tambor externo en forma rectangular que tiene en común dos cámaras para la producción de biochar con perforaciones para la liberación de energía o gases volátiles de combustión de la materia prima de entrada. El otro cilindro interno con finalidad de alimentar biomasa residual para el incremento de temperatura de pirólisis condicionados con perforaciones regulables de aireación y tamizado para la recolección de cenizas. El primer tambor externo tiene medidas de 0,50 x 0,30 x 0,60 cm. El cilindro interno tiene medida de 0,60 de altura por un radio de 0,25 cm.



**Figura 1.** Horno pirolítico usado en la producción del biochar.

Fuente: Ciclo de combustión de estufa pirolítico a nivel familiar<sup>8</sup>.

En las pruebas de bioensayo de toxicidad se usó semillas de rábano de las especies *Raphanus sativus* L., se realizó en base a los principios de prueba estática de toxicidad aguda<sup>9,10</sup> en las que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos del biochar de 4 concentraciones (1 %, 3 %, 5 %, y 7 %) en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los diez primeros días de crecimiento<sup>11</sup>.

**Producción del biochar.** El proceso productivo se realizó de la siguiente manera:

- Se controlaron las entradas de aire en ambos tambores o cámaras, debido a que la pirólisis se lleva a cabo en condiciones de ausencia de oxígeno, siendo el control principal del suministro del oxígeno sobre la cámara interna para la combustión térmica.
- Se llenó de biomasa residual a convertir en biochar. La cantidad dependió del tipo y cantidad necesaria de material sin compactar en las cámaras.
- La cámara externa se llenó con material combustible de podaduras (leña, ramas secas, hojas) Una vez completado todo el espacio libre se suministró el fuego para completar la combustión en la generación del biochar.
- Durante el proceso de pirólisis se monitorizó constantemente la temperatura con un termómetro infrarrojo tanto en el tope, medio y en el fondo de la unidad exterior. El proceso tiene una duración promedio de tres horas. Luego de su enfriamiento se retira para el pesado y separación de muestras para el análisis de laboratorio.

### Caracterización de los residuos y del biochar

Se caracterizó la materia prima a utilizar y el biochar resultante. La tabla 1 muestra los resultados del contenido de análisis y la metodología aplicada de las características morfológicas y estructurales de ambos materiales.

**Tabla 1.** Relación de contenido de análisis y metodología aplicada.

Nº	Contenido – Nutrientes	Unidad	Metodología
1	pH		AOAC 973,04 Cap. 2 Ed 19 Pág. 19. 53-54 2012
2	Humedad	(g/100 g)	NTP 311,012 1970
3	Cenizas	(g/100 g)	AOAC 967,04 Cap. 2 Ed 19 Pág. 19. 54 2012
4	Carbono total (C)	(g/100 g)	El analizador de COT SHIMADZU L5000
5	Nitrógeno total (N)	(g/100 g)	AOAC 955,04 Cap. 2 Ed 19 Pág. 19. 13-14 2012
6	Fósforo total (P)	(mg/kg)	AOAC 958,01 Cap. 2 Ed 19 Pág. 19. 5-6 2012
7	Potasio (K)	(mg/kg)	AOAC 983,02 Cap. 2 Ed 19 Pág. 19. 24-27 2012
8	Sodio (Na)	(mg/kg)	AOAC 965,09 Cap. 2 Ed 19 Pág. 19. 29-31 2012
9	Calcio (Ca)	(mg/kg)	AOAC 965,09 Cap. 2 Ed 19 Pág. 29. 29-31 2012
10	Magnesio (Mg)	(mg/kg)	AOAC 965,09 Cap. 2 Ed 19 Pág. 29. 29-31 2012
11	Cobre (Cu)	(mg/kg)	AOAC 965,09 Cap. 2 Ed 19 Pág. 29. 29-31 2012
12	Fierro (Fe)	(mg/kg)	AOAC 965,09 Cap. 2 Ed 19 Pág. 29. 29-31 2012
13	Manganeso (Mn)	(mg/kg)	AOAC 965,09 Cap. 2 Ed 19 Pág. 29. 29-31 2012
14	Zinc (Zn)	(mg/kg)	AOAC 965,09 Cap. 2 Ed 19 Pág. 29. 29-31 2012

Se determinó la densidad aparente y el porcentaje de rendimiento del biochar resultante mediante:

$$\text{Densidad aparente} = \frac{\text{Masa de materia seca}}{\text{Volumen del biochar resultante}}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Masa del biochar}}{\text{Masa de la biomasa}} \times 100$$

**Prueba de bioensayo.** Se adaptado el método<sup>10</sup> para la prueba del biochar<sup>11</sup>: Evaluándose el porcentaje de germinación y longitud del crecimiento del tallo, se realizaron los cálculos matemáticos con la finalidad de obtener el índice de germinación, para ello se calcularon dos índices: el porcentaje de germinación relativo (PGR) y crecimiento de tallo relativo (CTR) de cada tratamiento.

$$\text{PGR} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas en maceta}}{\text{N}^\circ \text{ de semillas sembradas en maceta}} \times 100$$

$$\text{CTR} = \frac{\text{Elongación del tallo de la plántula por maceta}}{\text{N}^\circ \text{ de semillas sembradas en maceta}} \times 100$$

$$\text{IG} = \frac{\text{PGR} \times \text{CTR}}{100}$$

Dónde:

PGR: Porcentaje de germinación relativo.

CTR: Crecimiento de tallo relativo.

IG: Índice de germinación

Los autores<sup>10,11</sup> recomiendan, para valores de  $\text{IG} \geq 80\%$ , el extracto del analito tratado no presenta sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración; así, valores de  $\text{IG} \leq 50\%$ , esto no indicaría que hay una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas y sí se obtiene como resultados valores entre 50 % y 80 % se interpretaría como la presencia moderada de estas sustancias.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS RESIDUOS ORGÁNICOS AVÍCOLAS

#### 1.1. Análisis elemental

La caracterización de la gallinaza (GG), pollinaza (CP) y gallinaza-pollinaza (GG-CP) se recogen en la tabla 2.

**Tabla 2.** Caracterización de los residuos avícolas de análisis elemental.

Biomasa	C (%)	N (%)	C/N	Ceniza (%)	Humedad (%)	pH
Gallinaza (GG)	17,61	1,90	9,27	62,80	10,63	8,62
Pollinaza (PO)	24,53	2,48	9,89	25,19	18,84	8,74
(GG-PO)	16,00	2,37	6,75	37,38	15,44	8,51

Fuente: Elaboración propia

Del análisis químico elemental, el contenido del carbono orgánico promedio obtenido es mayor en la pollinaza (24,53 %) que en la gallinaza (17,61 %), lo cual puede corroborarse con los resultados cercanos obtenidos por otro estudio<sup>12</sup>, siendo estos de 23,0 y 19,8 % de carbón, respectivamente; sin embargo, otro autor<sup>13</sup> reporta un valor de 31,71 % para gallinaza de jaula y de 38,70 % para la gallinaza de piso, siendo estos valores mayores al obtenido, así también se observa que la mezcla de ambos residuos avícolas presenta menor porcentaje (16,0 %).

El contenido de nitrógeno obtenido fue mayor para la pollinaza (2,48 %) que para la gallinaza (1,90 %). Otro autor<sup>4</sup> reportó valores cercanos (2,3 %) para la pollinaza, sin embargo el autor<sup>14</sup> reportó para la gallinaza 3,24 %, siendo este valor casi el doble del valor obtenido. Así, la relación carbono y nitrógeno (C/N) obtenido está entre (9,27-9,89) para la gallinaza y pollinaza, respectivamente, valor muy cercano al encontrado por otros autores<sup>4,13</sup> para la pollinaza 9,7 y 9,79, respectivamente, sin embargo, otro autor<sup>4</sup> reporta un valor un poco alto para la gallinaza (12,02), así<sup>14</sup>, reporta una pequeña variación (9,79), se observa sin embargo que la mezcla de estos dieron menores resultados (6,75).

Con respecto al porcentaje de cenizas obtenidas, la gallinaza reporta un valor bastante alto (62,8%), casi el doble con respecto al de la pollinaza (25,19 %), estos resultados se han corroborado<sup>15</sup>, siendo estos valores 28 y 15 % para la gallinaza y pollinaza, respectivamente.

La humedad reportada para la gallinaza es de 10,63 % y para la pollinaza de 18,84 %, sin embargo, otro autor<sup>14</sup> ha reportado para la gallinaza (26,08 %) siendo este valor mayor al doble del obtenido, así otros autores<sup>15</sup> han obtenido 23,14 % de humedad para muestras secas, siendo este valor no muy lejano al obtenido. Estos resultados, tanto para la gallinaza y pollinaza, se deben a que las muestras usadas para este estudio fueron secadas previamente a temperatura ambiente.

El pH de estos residuos avícolas varía entre 8,51-8,74 en la escala fuertemente alcalina, este intervalo se encuentra dentro de los valores reportados<sup>13</sup>, encontrándose estos en un intervalo de (8-9), otro autor<sup>4</sup> reportó valores un poco más altos de pH, siendo estos valores de 9,0 y 9,5 para la gallinaza y pollinaza, respectivamente.

## 1.2. Análisis de nutrientes

Los resultados del contenido de macro y micronutrientes como se observa en el análisis inmediato en la tabla 3.

**Tabla 3.** Caracterización química de los residuos avícolas.

Biomasa	N (g/100 g)	P (mg/kg)	K (mg/kg)	Na (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Zn (mg/kg)
Gallinaza (GG)	1,90	20578,72	34835,73	7920,46	269822,48	56,51	6363,08	87539,58	493,95	425,53
Pollinaza (PO)	2,48	12882,65	12470,29	7208,20	27217,44	42,82	1770,82	30040,69	364,56	380,38
(GG-PO)	2,37	18312,17	24894,81	8512,91	74349,30	55,02	3371,57	58580,32	423,49	421,83

Se evidencia que el contenido del nitrógeno de la pollinaza (2,48) es mayor que la gallinaza (1,90) y para el contenido de la mezcla (2,37). Así, el contenido de macronutrientes (P, K, Na, Ca y Mg) de la gallinaza presenta valores mucho mayores a los observados para la pollinaza, a excepción de nitrógeno, el cual es menor. En el caso del contenido de micronutrientes (Fe, Cu, Mn y Zn) de la gallinaza, estos presentan valores mayores con respecto a la pollinaza, siendo el contenido de hierro casi seis veces mayor al de la pollinaza, estos resultados se deben a que las camas de los pollos de engorde son menos ricos en nutrientes que las de las gallinas.

## 2. CARACTERIZACIÓN DEL BIOCHAR

### 2.1. Análisis físico elemental

Se encontró una diferencia significativa ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) entre la media de rendimientos de los tratamientos, se puede concluir que la media de los rendimientos del biochar de la gallinaza y pollinaza es muy significativa. El rendimiento medio de producción del biocarbón de la gallinaza es de 64,31 %, mientras de la pollinaza fue de 42,99 %, pero el rendimiento medio de la mezcla entre ellos es 55,14 %.

Se encontró una diferencia muy significativa ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) entre la media de la densidad aparente de la gallinaza y pollinaza. Se observa para gallinaza una densidad aparente entre 0,564-0,580 g/cm<sup>3</sup> e intervalos de 0,330 - 0,341 g/cm<sup>3</sup> para la pollinaza. Los resultados de la densidad aparente de pollinaza están dentro de los límites óptimos recomendables por reducir notablemente el volumen original hasta del 61,52 %, mientras la disminución del volumen original para la gallinaza es de 56,26 % lo cual tiene una enorme ventaja en la conversión en biochar, los residuos avícolas en términos de volumen serían una buena alternativa de manejo y gestión.

Las características morfológicas y estructurales resultantes del biochar de la gallinaza y pollinaza son como se muestra en las imágenes de la figura 2.



**Figura 2.** Muestras representativas de biomasa residual y respectivo biochar resultante.  
a) Muestra para gallinaza, b) Muestra para pollinaza.

En la tabla 4 se detallan el tiempo y promedio de temperatura de pirólisis empleado, porcentaje de rendimientos y densidad del biochar por cada tratamiento y sus respectivas repeticiones.

**Tabla 5.** Resultados del análisis físico elemental del biochar.

BIOCHAR	REP	BIOMASA (g)	BIOCHAR RESULTANTE (g)	RENDIMIENTO BIOCHAR (%)	DENSIDAD BIOCHAR g/cm <sup>3</sup>	PROM. T°C	TIEMPO PROM. PIRÓLISIS Hrs.
GALLINAZA (GG)	R1	4 000	2 567	64,18	0,567	556	3
	R2	4 000	2 578	64,45	0,58	545	3
	R3	4 000	2 572	64,3	0,564	549	3
POLLINAZA (CP)	R1	3 000	1 291	43,03	0,333	529	3
	R2	3 000	1 285	42,83	0,341	519	3
	R3	3 000	1 294	43,13	0,33	523	3
GG-CP	R1	3 000	1 649	54,97	0,387	539	3
	R2	3 000	1 654	55,13	0,385	544	3
	R3	3 000	1 660	55,33	0,383	550	3

## 2.2. Análisis químico elemental

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos del análisis químico elemental para las muestras de biochar de gallinaza, pollinaza y la mezcla de ambos.

**Tabla 5.** Análisis químico elemental del biochar resultante en relación a la materia prima original.

BIOCHAR	Rep	C (g/100 g)	C/N	Ceniza (g/100 g)	Humedad (%)	pH
Gallinaza (GG)	R0	17,61	9,27	62,8	10,63	8,62
	R1	<b>8,47</b>	<b>7,92</b>	<b>80,36</b>	<b>0,95</b>	<b>10,23</b>
	R2	<b>7,85</b>	<b>7,27</b>	<b>81,84</b>	<b>0,59</b>	<b>10,21</b>
	R3	<b>8,47</b>	<b>8,47</b>	<b>83,86</b>	<b>0,57</b>	<b>10,02</b>
Pollinaza (PO)	R0	24,53	9,89	25,19	18,84	8,74
	R1	<b>9,53</b>	<b>4,84</b>	<b>55,2</b>	<b>1,57</b>	<b>10,68</b>
	R2	<b>10,83</b>	<b>4,77</b>	<b>52,29</b>	<b>1,89</b>	<b>10,98</b>
	R3	<b>8,07</b>	<b>4,23</b>	<b>56,47</b>	<b>1,93</b>	<b>11,01</b>
(GG-PO)	R0	16	6,75	37,38	15,44	8,51
	R1	<b>2,71</b>	<b>1,9</b>	<b>71,53</b>	<b>1,27</b>	<b>10,18</b>
	R2	<b>6,67</b>	<b>5,17</b>	<b>71,65</b>	<b>1,59</b>	<b>9,73</b>
	R3	<b>6,44</b>	<b>4,92</b>	<b>69,28</b>	<b>1,33</b>	<b>10,12</b>

Fuente: La Molina Calidad Total Laboratorios

**Carbono orgánico total:**

El análisis estadístico muestra una diferencia no significativa ( $p$ -valor  $> 0,5$ ) entre el contenido de carbono de gallinaza, pollinaza y la mezcla. Los resultados promedios del carbono orgánico total del biochar de gallinaza fue 8,26 g/100g, la pollinaza 9,48 g/100g, la mezcla contiene un resultado inferior de 5,27 g/100g. Se observa que la materia prima original de mayor concentración como la pollinaza (24,53), genera una concentración media mayor de carbono orgánico total de 9,38 g/100 g. Todos estos datos son inferiores al contenido de carbono total en camas de pollo (42,9 g/kg)<sup>14</sup>. Este parámetro es muy importante para el biochar por la fijación del carbón en el suelo lo cual le confiere estabilidad por periodos largos, así como la cantidad y disponibilidad de nutrientes en el suelo<sup>3</sup>, otro autor<sup>16</sup> indica mayores contenidos de carbono al obtenido, siendo este entre intervalos 29 a 46,10 g/100 g. de biochar para rangos de temperatura de 350 a 770°C.

**Relación C/N:**

Los resultados de la relación C/N de los biocarbones es significativa entre la gallinaza (7,88) y pollinaza (4,61), mientras la mezcla gallinaza - pollinaza resultó una media inferior (3,99). Estos resultados son inferiores a (13,0)<sup>14</sup> obtenidos en biocarbones de cama de pollo<sup>17</sup>. Otro autor<sup>18</sup> indica una relación C/N entre 7 - 400 para biocarbones de restos avícolas, la relación C/N es un parámetro importante, ya que indica la habilidad de un sustrato orgánico de mineralizar e introducir nitrógeno inorgánico al suelo, un valor alto podría causar inmovilización del nitrógeno inorgánico por los microorganismos causando deficiencia de nitrógeno para el crecimiento de plantas. El resultado obtenido es bajo al comparar la relación C/N con el requerimiento para compost (25 - 30)<sup>1</sup>.

### Valores de pH:

Hay una diferencia muy significativa ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) entre la media de valores de pH de biochar de gallinaza y pollinaza, pero con resultados similares entre el biochar de la gallinaza y la mezcla gallinaza - pollinaza. Los valores media de pH del biochar gallinaza fue 10,15, mientras la pollinaza tiene una media alta de 10,89 y la mezcla contiene valor medio inferior (10,01). Los datos revelan que los valores del pH de la gallinaza y pollinaza son muy fuertemente alcalinos, así como las correspondientes mezclas. Estos valores son similares<sup>14</sup>, quienes observaron el valor de pH (10,2) muy alcalinos en camas de pollo. Así, otro autor<sup>19</sup> indica que la mayoría de los biochars producidos a pirólisis lenta puede ir de 7,5 a 10,5, es decir de medianamente alcalinos a fuertemente alcalinos a altas temperaturas.

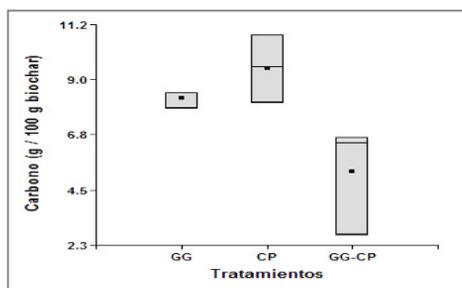


Figura 3. Carbono orgánico total.

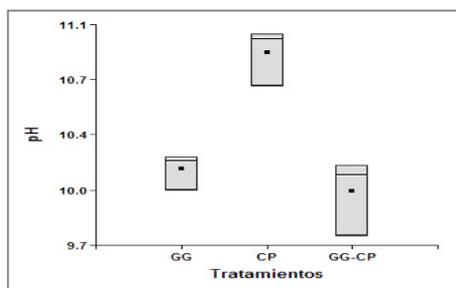


Figura 4. Valores del pH.

### 2.3. Análisis proximal

#### Humedad:

Presenta una diferencia significativa ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) entre la media de humedad de biochar de gallinaza y pollinaza. El contenido de humedad en los biocarbones de la gallinaza tuvo una concentración media de 0,70 %, en la pollinaza resulta una concentración mayor de 1,80 % y en la mezcla gallinaza - pollinaza de 1,40 %. La cantidad de humedad presente en el biochar dependerá del incremento de la temperatura en el proceso de la pirólisis y también del método usado para su determinación que en la presente investigación se usó la norma peruana NTP 311.012 1970.

#### Cenizas:

El contenido de cenizas del biochar muestra una diferencia significativa ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) entre la media de los tratamientos. El contenido de cenizas en el biochar de los residuos orgánicos depende del contenido de cenizas de la biomasa de origen. El contenido medio de cenizas del biochar resulta alto en el biochar de la gallinaza (82,02 g/100 g) mientras de la pollinaza tuvo una media inferior (54,65 g/100 g). Se observa que el contenido de cenizas de biochar de pollinaza son superiores a los resultados reportados por otro autor<sup>38</sup> de 30,7 % y 46,2 % en peso a conversión térmica de 350°C y 700°C, respectivamente.

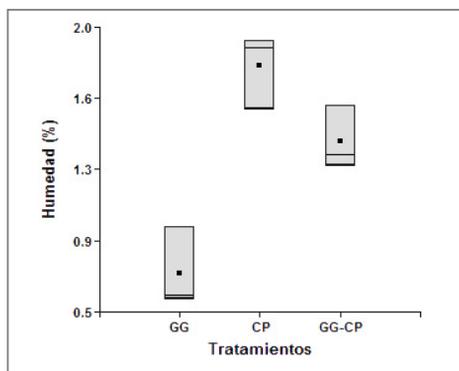


Figura 5. Humedad del biochar.

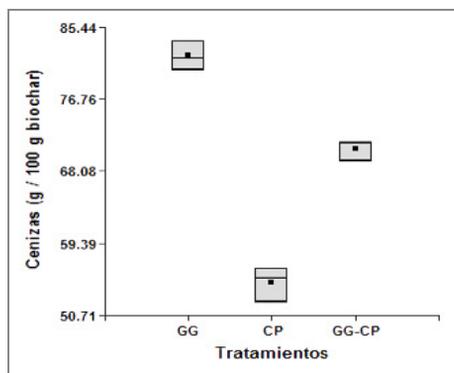


Figura 6. Cenizas del biochar.

## 2.4. Análisis de nutrientes

### 2.4.1. Micronutrientes

El análisis estadístico del contenido de micronutrientes del biochar, tanto de gallinaza y pollinaza, muestran una diferencia significativa ( $p$ -valor  $< 0,05$ ), lo cual se ve reflejado en los resultados promedios (tabla 6) del contenido de cobre, hierro, manganeso y zinc, los cuales son mayores comparados con la materia prima original, para el biochar de pollinaza se observa contenidos de cobre, manganeso y zinc casi al doble del contenido del material original, sin embargo el contenido de hierro es cinco veces mayor al contenido de micronutrientes de la materia prima original. Los resultados del biochar de la mezcla muestran resultados casi al doble del contenido de cobre, hierro, manganeso y zinc, con respecto a la materia prima original.

### 2.4.2. Macronutrientes

Para los macronutrientes el análisis estadístico muestra una diferencia significativa ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) lo cual se evidencia en la tabla 6, esta muestra los resultados promedios tanto para el biochar de gallinaza, pollinaza y de la mezcla de ambas. Se evidencia que el contenido de nitrógeno es un poco menor para el biochar de gallinaza (1,29 mg/kg) y la mezcla de ambas (1,6 mg/kg), con respecto al contenido del material original gallinaza (1,9 mg/kg) y de la mezcla de ambas (2,37 mg/kg), sin embargo, el contenido de calcio (203360,84) en el biochar de gallinaza es bastante menor al del material original (269822,48 mg/kg), así como el contenido de sodio en el biochar de pollinaza (5898,39) es menor con respecto a la materia prima (7208,2 mg/kg). Mientras que el contenido de fósforo en el biochar de pollinaza (25270,92 mg/kg) y el contenido de potasio en el biochar de la mezcla (48807,23 mg/kg) es el doble al de la materia prima (12882,65, 24894,81) mg/kg de fósforo y potasio, respectivamente, para el caso del biochar de gallinaza el contenido de potasio es casi el doble al del material original.

**Tabla 6.** Análisis del contenido de nutrientes del biochar a partir de los residuos avícolas (R.A).

BIOCHAR	Rep	N (mg/kg)	P (mg/kg)	K (mg/kg)	Na (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Zn (mg/kg)
Gallinaza (GG)	R0	1,9	20578,72	34835,73	7920,46	269822,48	56,51	6363,08	87539,58	493,95	425,53
	R1	1,07	36232,88	68664,52	784,43	168798,73	101,94	6820,06	94776,18	852,97	741,82
	R2	1,08	36202,59	57554,02	14809,57	218355,81	94,92	8097,47	99560,02	825,12	717,83
	R3	1	30211,8	44683,31	13750,12	156466,34	91,18	7910,44	89293,98	735,1	617,36
Prom	1,26	30806,50	51434,40	9316,15	203360,84	86,14	7297,76	92792,44	726,79	625,64	
Pollinaza (PO)	R0	2,48	12882,65	12470,29	7208,2	27217,44	42,82	1770,82	30040,69	364,56	380,38
	R1	1,97	30128,04	71165,96	764,05	64704,42	103,14	4878,31	69302,7	925,81	706,13
	R2	2,27	29454,86	63095,44	14852,05	56112,77	72,88	3755,6	63722,21	832,86	628,33
	R3	1,91	28618,14	61839,87	769,25	55236,33	75,83	5552,68	61578,07	769,25	564,6
Prom	2,16	25270,92	52142,89	5898,39	50817,74	73,67	3989,35	56160,92	723,12	569,86	
(GG-PO)	R0	2,37	18312,17	24894,81	8512,91	74349,3	55,02	3371,57	58580,32	423,49	421,83
	R1	1,43	29202,75	57816,37	14294,83	238768,75	93,75	6193,56	97784,22	756,6	714,87
	R2	1,29	31553,87	59907,88	15686,71	259249,4	103,44	5413,49	92284,84	780,15	714,31
	R3	1,31	27083,38	52609,86	9707,99	304813,26	100,29	5919,38	99263,69	735,64	705,72
Prom	1,6	26538,0425	48807,23	12050,61	219295,18	88,13	5224,50	86978,27	673,97	639,18	

Fuente: Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes

### 3. ANÁLISIS DE BIOENSAYOS

Los análisis de bioensayos se muestran en la tabla 7 y la figura 7, estos presentan los resultados de los bioensayos y se evidencia la media del porcentaje de índice de germinación (IG) como producto del porcentaje de germinación relativa (PGR) y el crecimiento del tallo relativo (CTR). Para ello se siguió la metodología del test para la determinación del Índice de Germinación (IG) que permitió determinar la media del porcentaje de germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas o tallos<sup>9</sup>.

**Tabla 7.** Resumen de indicadores de bioensayos de toxicidad de los biocarbones.

Trats. (%)	Gallinaza (GG)			Pollinaza (CP)		
	PGR	CTR	IG (%)	PGR	CTR	IG (%)
1	70	109,9	76,93	100	61,2	61,2
	60	64,2	38,52	90	65,6	59,04
	80	101	80,8	90	75,8	68,22
3	<b>70</b>	<b>91,7</b>	<b>65,42</b>	<b>93,33</b>	<b>67,53</b>	<b>62,82</b>
	80	91,1	72,88	80	62,6	50,08
	90	85,8	77,22	90	33,1	29,79
5	90	100,1	90,09	80	43,8	35,04
	<b>86,67</b>	<b>92,33</b>	<b>80,06</b>	<b>83,33</b>	<b>46,5</b>	<b>38,3</b>
	80	75,6	60,48	60	18,8	11,28
7	80	93,3	74,64	50	22,6	11,3
	80	87,4	69,92	60	45,2	27,12
	<b>80</b>	<b>85,43</b>	<b>68,35</b>	<b>56,67</b>	<b>28,87</b>	<b>16,57</b>
7	100	43,8	43,8	30	19	5,7
	100	72,3	72,3	50	12,6	6,3
	70	83,1	58,17	50	9,2	4,6
	<b>90</b>	<b>66,4</b>	<b>58,09</b>	<b>43,33</b>	<b>13,6</b>	<b>5,53</b>

PGR: Porcentaje de germinación relativa

CTR: Crecimiento del tallo relativo

IG (%): Porcentaje de índice de germinación

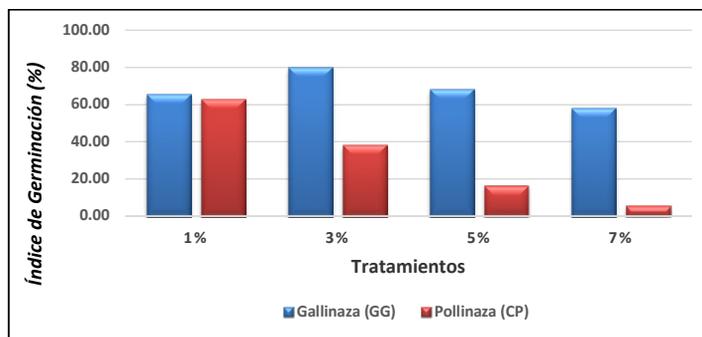


Figura 7. Índice de germinación en los cuatro tratamientos de biocarbones.

Los resultados del índice de germinación (IG) de las semillas de rabanito con la gallinaza fue superior (80,06 %) en tratamiento del 3 %, mientras el tratamiento al 1 % de biochar de pollinaza produjo el IG de 62,82 %. Se concluye que los rabanitos son especies que son sensibles a sustancias fitotóxicas. Los biochars de origen de la gallinaza en tratamientos de 1 % a 7 % indican presencias moderadas de sustancias tóxicas. Pero los biochar de origen de la pollinaza en concentraciones superiores al 3 % inhiben la germinación de las semillas por la fuerte presencia de concentraciones de sustancias tóxicas.

En la tabla 8 y las figuras 8 y 9 se presentan los resultados del peso fresco de los diez primeros días de plántulas de semillas de rabanito de los cuatro tratamientos.

Tabla 8. Crecimiento de tallo y peso fresco de plántulas de semillas de rabanito.

Trats. (%)	Crecimiento de tallo (cm)		Peso de biomasa fresco (g)	
	Gallinaza (GG)	Pollinaza (CP)	Gallinaza (GG)	Pollinaza (CP)
1	10,99	6,12	0,934	0,6993
	6,42	6,56	0,4618	0,6455
	10,1	7,58	0,8429	0,8116
	<b>9,17</b>	<b>6,75</b>	<b>0,7462</b>	<b>0,7188</b>
	9,11	6,26	0,679	0,5227
3	8,58	3,31	0,7983	0,4464
	10,01	4,38	0,8027	0,4138
	<b>9,23</b>	<b>4,65</b>	<b>0,76</b>	<b>0,461</b>
	7,56	1,88	0,6032	0,2426
5	9,33	2,26	0,798	0,2107
	8,74	4,52	0,8024	0,4394
	<b>8,54</b>	<b>2,89</b>	<b>0,7345</b>	<b>0,2976</b>
	4,38	1,9	0,5444	0,1008
7	7,23	1,26	0,8048	0,1306
	8,31	0,92	0,6052	0,1738
	<b>6,64</b>	<b>1,36</b>	<b>0,6515</b>	<b>0,1351</b>

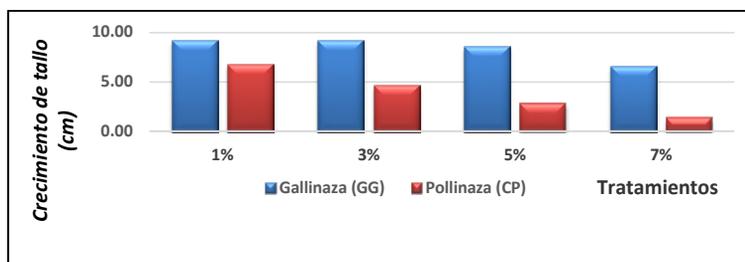


Figura 8. Crecimiento de tallo de plántulas con diferentes tratamientos de biochar.

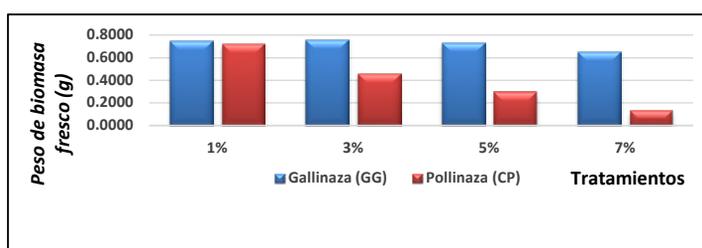


Figura 9. Peso fresco de la longitud del crecimiento de las plántulas por tratamientos.

El crecimiento de las plántulas con el biochar de gallinaza (GG) fueron mayores para los tratamientos de 1 % y 3 %. Los tratamientos con el biochar de la pollinaza (CP) demostraron un mejor crecimiento de las plántulas con el 1 %. En base a la evidencia de las medias del peso fresco de las plántulas de las semillas de rabanito, el tratamiento al 3 % de biochar de la gallinaza (GG) presentó un peso fresco mayor (0,7600 g). Mientras los biochar de la pollinaza (CP) aplicados en tratamientos al 1 %, presentaron una media de peso fresco (0,7188 g) mayor que al 3 %, 5 % y 7 %.

## CONCLUSIONES

La producción de biochar de gallinaza presenta mayores rendimientos promedio de 64,31 % a diferencia del biochar de pollinaza 43,00 %, siendo los rendimientos de estos mayores al obtenido de biocarbones de biomasa lignocelulósica (27 %) <sup>21</sup>.

La caracterización química del biochar, en particular de la pollinaza, presenta valores óptimos de densidad aparente, con la consecuente reducción en volumen de la materia prima original. Se puede lograr a ocupar menor espacio de almacenamiento, una característica beneficiosa de manejo, transporte y comercialización de los residuos. Asimismo, se observa valores altos de pH (10,23) en ambos biocarbones, lo cual indica que podría usarse para la recuperación de suelos ácidos característicos de la selva.

El índice de germinación, como variable que integra diferentes grados de fitotoxicidad, es más elevado en los biocarbones de origen de la gallinaza que en la de la pollinaza al 3 %. La adición de los biocarbones de los residuos avícolas, en particular de la gallinaza, aumenta considerablemente el crecimiento de las semillas y los pesos frescos de las plántulas a concentraciones de 1 % y 3 % y una adición superior a estos porcentajes provocan efectos negativos con mayor evidencia en los biocarbones de la pollinaza.

### AGRADECIMIENTO

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Agraria La Molina, por el financiamiento (concurso de Innovación Tecnológica IT - UNALM - 2016) del proyecto de investigación “Producción y caracterización de biochar vegetal a partir de residuos orgánicos avícolas y biomasa residual de la podadura de áreas verdes”.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García C, Rosas JG, Sánchez ME, Pascual JE, Hernández MT. Enmiendas orgánicas de nueva generación: Biochar y otras biomoléculas. Madrid: Editorial Mundi-Prensa; 2014.
2. MINAN DL N° 1278. Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos. El Peruano [Internet]. 2016. [Consultado 4 jun 2019]. Disponible en: <http://www.minam.gob.pe/disposiciones/decreto-legislativo-n-1278/>
3. Escalante A, Pérez G, Hidalgo C, López J, Campo J, Valtierra E, Etchevers J. Biocarbón (biochar) I: Naturaleza, historia, fabricación y uso en el suelo. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. A.C. México. Terra Latinoamericana. 2016; 34(3): 367-382.
4. Estrada MM. Manejo y Procesamiento de la gallinaza. Corporación Universitaria Lasallista. Antioquia, Colombia. Revista Lasallista de investigación. 2005; 2(1): 43-48.
5. Leonardo-redes. Cómo contribuyen los residuos al desarrollo sostenible y al cambio climático [internet]. [Consultado 3 Jul 2019]. Disponible en: <https://www.leonardo-gr.com/es/desarrollo-sostenible-cambio-climatico-y-gestion-residuos>
6. Conti R. Sintesi e caratterizzazione di carboni ottenuti dalla pirolisi di biomasse (biochar) per applicazioni in campo agricolo. [Yesi de laurea]. Boloña: Universidad di Bologna, Italia; 2013
7. Zhao L, Cao X, Masek O, Zimmerman A. Heterogeneity of biochar properties as a function of feedstock sources and production temperatures. J Hazard Mater. 2013; 256-257: 1-9.
8. Roth C. Micro-gasificación: Cocinar con gas procedente de la biomasa sólida y seca Una introducción al concepto de las tecnologías para combustión de gas-madera y sus aplicaciones para cocinar. 1ra edición. Tegucigalpa: Universidad Agrícola Panamericana Zamorano (Honduras); 2011

9. Sobrero MC, Ronco A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) En Castillo G. editores. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Otawa, Canadá: IDRC, IMTA; 2004 p. 55-67
10. Zucconi F, Pera A Forte M, De Bertoldi M. Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle*. 1981; 22:54-57.
11. Cuevas M, Rosaldo J, López J. Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con semillas. En: Cuevas Mc, Espinosa G, Ilizaliturri CA, Ania Mendoza A. Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. Primera edición. México: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales; 2012. p. 87-106.
12. Pastor Y, Martínez MM, Valdés R. Construcción de una planta de producción de biochar a partir de purines. [Internet]. Cartagena: Universidad Politécnica de Cartagena, España; 2013. [Consultado 05 Jun 2019]. Disponible en: <https://www.upct.es/~orientap/agrolola/biochar.pdf>
13. Carhuancho F, Ramírez, J, Guerrero J. Gestión ambiental de residuos avícolas mediante digestión anaeróbica para la producción de fertilizantes orgánicos líquidos. *Anales Científico*. 2015; 76(1): 125-132.
14. De Andrade CA, Bibar MPS, Coscione AR, Pires Amm, Soares AG. Mineralização e efeitos de biocarvão de cama de frango sobre a capacidade de troca catiônica do solo. *Pesqui Agropecu Bras*. 2015; 50(5): 407- 416.
15. Carhuancho F. Aprovechamiento del estiércol de gallina para la elaboración de biol en biodigestores tipo batch como propuesta al manejo de residuos avícola. [Tesis pregrado]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2012.
16. Guo M, Shen Y, He Z. Chapter 8. Poultry Litter-Based Biochar: Preparation, characterization and utilization. En: He Z. *Applied Research of Animal Manure: Challenges and Opportunities beyond the Adverse Environmental Concerns*. New York: Nova Science Publishers; 2012. p.169-202
17. Williams CM. Poultry waste management in developing countries. [Internet]. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Poultry Development Review. Agriculture and Consumer Protection Department, Animal Production and Health Division, 2011. [Consultado 05 Jun 2019]. Disponible en: [http://www.fao.org/ag/againfo/themes/documents/poultry/PDR\\_environment\\_main.pdf](http://www.fao.org/ag/againfo/themes/documents/poultry/PDR_environment_main.pdf)
18. Cantrell Kb, Hunt PG, Uchimiya M, Novak JM, Ro KS. Impact of pyrolysis temperature and manure source on physicochemical characteristics of biochar. *Bioresource Technol*. 2012; 107: 419-428
19. Bedussi F. Valutazione delle potenzialità del biochar come componente dei substrati di coltivazione. [Tesis doctoral]. Milano: Università degli Studi di Milano, Italia; 2016.
20. Mohan D, Pittman CU, Steele PH. Pyrolysis of wood/Biomass for Bio-oil:A Critical Review. *Energy Fuels*. 2006; 20(3):848-889.

## PURIFICACIÓN Y ALGUNAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE UNA NUEVA FOSFOLIPASA A2 NO MIOTÓXICA DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops atrox*

Edwin Quispe<sup>1\*</sup>, Daniel Torrejón<sup>1</sup>, Lorgio Bautista<sup>1</sup>, Gustavo Sandoval<sup>1</sup>, Edith Rodríguez<sup>1</sup>, Fanny Lazo<sup>1</sup>, Dan vivas-Ruiz<sup>1</sup> y Armando Yarlequé<sup>1</sup>

### RESUMEN

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) del veneno de las serpientes, son enzimas con una variedad de efectos biológicos, debido a sus diferentes isoformas y algunas pudiendo ser miotoxinas. El objetivo de la investigación fue purificar, caracterizar y evaluar la actividad miotóxica de una isoforma de PLA<sub>2</sub> ácida (BaPer-PLA<sub>2a</sub>). Se purificó por DEAE Sephadex-A50, Sephadex-G75 y un sistema automatizado de presión media-NGC. La BaPer-PLA<sub>2a</sub> tuvo una actividad específica de 34,1 U/mg y un peso molecular de ~14,5 kDa por PAGE-SDS en condiciones no reductoras. Del veneno se obtuvo el ARN total, para la síntesis de ADNc y un amplificado de ~480 pb. Se dedujo de la secuencia de ADNc una proteína madura de 124 aminoácidos con un punto isoeléctrico (4,41), siendo una isoforma ácida, asimismo presentó una estructura primaria con regiones conservadas y los residuos His48, Asp49 y Tyr52 identificados en el centro catalítico. Adicionalmente, el modelo teórico estructural posee una identidad mayor al 70 % con otras PLA<sub>2</sub> ácidas. Finalmente, la BaPer-PLA<sub>2a</sub> no presenta actividad miotóxica, sin embargo, al combinarla con la isoforma de PLA<sub>2</sub> básica incrementó la actividad miotoxina de esta última en 21,58 %.

**Palabras clave:** *Bothrops atrox*, veneno, purificación, fosfolipasa A<sub>2</sub> ácida, miotoxicidad.

## PURIFICATION AND SOME BIOCHEMICAL AND MOLECULAR PROPERTIES OF AN NEW NOT MYOTOXIC PHOSPHOLIPASE A2 FROM *Bothrops atrox* SNAKE VENOM

### ABSTRACT

Phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) from snake venom are enzymes with highly variety of biological effects, due to their different isoforms and some may be myotoxins. This research aimed was to purify, characterize and evaluate the myotoxic activity of an isoform of acid PLA<sub>2</sub> (BaPer-PLA<sub>2a</sub>). For purification, in DEAE Sephadex-A50, Sephadex-G75 and an automated

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.

\* edwin.quispe@unmsm.edu.pe

medium pressure system-NGC were used. BaPer-PLA2a had a specific activity of 34.1 U/mg and a MW of ~ 14.5 kDa by SDS-PAGE, non-reducing conditions. From venom were obtained total RNA, to synthesis of cDNA and an amplified of ~ 480 bp. A mature protein of 124 amino acids was deduced from the cDNA sequence with a pI (4.41), being an acidic isoform, likewise presented primary structure with conserved regions and residues His48, Asp49 and Tyr52 identified in the catalytic center. Additionally, the structural theoretical model has an identity greater than 70 % with other acidic PLA2. Finally, BaPer-PLA2a did not have myotoxic activity, however, when combined with the basic PLA2 isoform increased the last's myotoxic activity in 21.58 %.

**Key words:** *Bothrops atrox*, venom, purification, acidic phospholipase A2, myotoxicity.

## INTRODUCCIÓN

Los venenos de las serpientes son una mezcla de distintas proteínas, las cuales le han permitido sobrevivir a lo largo del tiempo, ya que, mediante las mismas, han desarrollado un mecanismo de defensa y captura hacia su presa. En este veneno destacan las fosfolipasas A<sub>2</sub> (E.C. 3.1.1.4), la cual hidroliza a los fosfolípidos en la posición n-2 del glicerol, liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos<sup>3,8</sup>. Además, existen otras proteínas, tales como; metaloproteasas, serino proteasas, L-aminoácido oxidasas, hialuronidasas y proteína similar a trombina<sup>7</sup>, las cuales permiten que el veneno se difunda en el tejido, generando diversos efectos biológicos. La superfamilia de fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) presenta una clasificación de acuerdo a su origen, secuencias aminoacídicas, estructura y función, pudiendo ser; secretoras, citosólicas, lisosomales, dependientes o independientes de calcio<sup>3</sup>.

En el Perú, la serpiente *Bothrops atrox* es la más peligrosa y causante de la mayoría de envenenamientos. No obstante, hay mucho interés en los componentes no sólo para generar un antiveneno sino porque presenta ciertas aplicaciones clínicas. Por ello, se realizó un estudio proteómico de tres serpientes peruanas del género *Bothrops* donde concluyen que la PLA<sub>2</sub> es la segunda en abundancia en el veneno<sup>7</sup>. Además, se han estudiado a las PLA<sub>2</sub> en las serpientes, *L. muta*<sup>6</sup> y *B. atrox*<sup>5</sup>. Además, se caracterizó por primera vez a la miotoxina del veneno en *B. brazili*<sup>17</sup>. No obstante, aún no se ha investigado a las isoformas de PLA<sub>2</sub> ácidas en *B. atrox* ni su efecto en la miotoxicidad. Por ello, tal situación conduce a explorar en mayor profundidad este tipo de efecto biológico.

Las PLA<sub>2</sub> pertenece al grupo II, a su vez tienen dos subgrupos: Asp49(D49) y Lys49(K49). Dentro de cada subgrupo, hay a su vez isoformas pudiendo ser; Asp49(D49) ácidas<sup>1,16,19,20</sup>, Asp(D49) básicas<sup>10,12</sup> y Lys49 (K49) básicas<sup>10,12</sup>, las cuales tienen diversos efectos biológicos. La isoforma básica ha sido la más investigada, siendo altamente miotóxica<sup>5,10,12</sup>, en tanto que a la isoforma ácida también se le atribuye diversos efectos biológicos; miotóxica<sup>1,2,16,18</sup>, hemolítica indirecta<sup>16</sup>, inhibidora de agregación plaquetaria<sup>1,16,18</sup> e hipotensiva<sup>14,20</sup>. No obstante, de todos ellos, el efecto miotóxico es el más grave ya que puede dañar irreversiblemente el tejido muscular y dar lugar a amputaciones. Además, se ha reportado que la sinergia entre las miotoxinas D49 y K49, potencian el efecto miotóxico<sup>12</sup>.

Por otro lado, la predicción estructural teórica terciaria de la isoforma de PLA<sub>2</sub> ácida puede permitir entender la relación estructura-función durante el envenenamiento. Dentro de este panorama, la presente investigación estuvo enfocada en aislar a la primera isoforma de PLA<sub>2</sub> ácida (BaPer-PLA<sub>2a</sub>), conocer sus propiedades bioquímicas, moleculares, estructural y fundamentalmente su relación en el proceso miotóxico, el cual presenta gran importancia clínica, teniendo en cuenta que esta acción biológica es la menos sensible a la neutralización con el antiveneno comercial.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Muestras

El veneno se obtuvo de la serpiente peruana *Bothrops atrox* “jergón” de la zona de Alto Marañón, departamento de Amazonas, mantenida en cautiverio en el serpentario “Oswaldo Meneses” - UNMSM. El veneno extraído fue liofilizado y conservado a 0°C, hasta su empleo.

### Purificación de BaPer-PLA<sub>2a</sub>

Se resuspendió 120 mg de veneno liofilizado en acetato de amonio 50 mM a pH 6,4, se centrifugó a 4000 rpm por 20 min para eliminar restos insolubles. El sobrenadante fue aplicado a una columna cromatográfica de intercambio aniónico DEAE-Sephadex-A50 (16,5 cm x 1,8 cm) equilibrada con buffer de elución acetato de amonio 50 mM a pH 6,4 a un flujo de ~12 mL/h. Para eluir las proteínas ligadas a la resina se cambió el buffer isocrático a uno que contenía NaCl 0,3 M y 0,6 M. Aquellas fracciones que mostraron actividad enzimática, fueron juntadas y concentradas para aplicarlas a una columna cromatográfica de exclusión molecular Sephadex-G75 (58 cm x 1,5 cm), equilibrada con el buffer acetato de amonio 50 mM a pH 6,4 a un flujo de ~14 mL/h, colectando fracciones de 2 mL en un equipo colector (Pharmacia LKB SuperFrac). Finalmente, se empleó un sistema cromatográfico automatizado de presión media-NGC (Bio-Rad), utilizando una columna de intercambio anionico ENrichQ (5x50 mm), equilibrada con el buffer de elución de acetato de amonio 50 mM a pH 6,4 y se generó una gradiente de NaCl 0,1-1,0 M. Esta última corrida fue realizada a un flujo de 0,8 mL/min, colectando fracciones de 0,5 mL.

### Cuantificación de proteínas

Se realizó mediante dos formas; por absorbancia de luz UV a 280 nm con el espectrofotómetro Spectronic Genesys5 (Spectronic Ins) y por el método de Lowry<sup>11</sup> empleando albúmina bovina como proteína estándar.

### Actividad enzimática

Se determinó la actividad enzimática de la fosfolipasa A2 ácida empleando el método descrito por Vidal y Stoppani<sup>22</sup>. Se utilizó el sustrato en una relación (4:5) de yema de huevo y buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7.4 y CaCl<sub>2</sub> 10 mM), respectivamente. Se empleó 1,5 mL de sustrato con 100 µL de veneno crudo o 50µL proteína purificada. La mezcla fue pre-incubada en un baño maría a 37°C por 15 min y se midió el retardo de coagulación de la yema de huevo a 100°C. La actividad específica se expresó como el tiempo de retardo en la coagulación por minuto y miligramo de proteína (U/mg).

### **Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)**

Se procedió de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli<sup>9</sup>. La muestra fue incubada a 100°C y se preparó un gel acrilamida al 15 %. Se corrió en condiciones reductoras (0,5% β-mercaptoetanol) y no reductoras a 100V en un sistema electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell, 4-Gel System (Bio-Rad). La tinción del gel fue con azul brillante de Coomassie R-250 por 15 min y la revelación de las bandas se obtuvo por decoloración con una mezcla de metanol, etanol, ácido acético glacial y agua en una relación de 2:1:5:6,5, respectivamente. Se empleó como patrón de bandas proteicas Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

### **Actividad miotóxica**

Se empleó ratones de la línea Balb/c (18-22g, n=3 por grupo) del Instituto Nacional de Salud (INS), Lima-Perú. Los cuidados éticos de los animales fueron en base; International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (1985), by the Council for International Organizations of Medical Sciences (COIMS). En un primer grupo se inyectó en el músculo gastrocnemius, la enzima purificada BaPer-PLA<sub>2a</sub> (30 µg/100 µL). En un segundo grupo fue inyectada la PLA<sub>2</sub> básica miotóxica (20 µg/100µL). En un tercer grupo, la combinación entre la BaPer-PLA<sub>2a</sub> y la PLA<sub>2</sub> básica miotóxica (5 µg + 20 µg/100 µL) y como control negativo se empleó 100 µL de solución salina. Posterior a las tres horas de la inoculación, se colectó sangre de la vena facial que fue recibida en tubos de 1,5 mL, conteniendo 40 µL de citrato de sodio al 3,8 %. La sangre fue centrifugada a 2000 rpm por 10 min para la liberación del plasma con creatina quinasa (CK). Se utilizó el kit CK-NAC FS\* (DiaSys, GmbH-Germany), donde se empleó 40 µL de plasma con 1 mL del kit. La lectura de absorbancia fue a 340 nm, realizada en un espectrofotómetro Genesys5 (Spectronic Ins.) y la actividad creatina quinasa (CK) fue expresada en (U/L).

### **Diseño de cebadores**

Los cebadores se diseñaron a partir de un alineamiento múltiple de las secuencias de PLA2 ácidas depositadas en el Gen Bank correspondiente a las especies: *B. moojeni* (HQ327311.1), *B. neuwiedi pauloensis* (GQ850458.1), *B. asper* (MF319968.1), *B. jararacussu* (AY145836.1), *B. diporus* (JQ661499.1; JQ661500.1) y de *B. erythromelas* (DQ359953.1). Los cebadores fueron diseñados manualmente tomando en cuenta las regiones no traducidas (UTRs) ubicados en los extremos del gen (F1BAPLA2 –R1BAPLA2) y sintetizados por el fabricante (Invitrogen).

### **Aislamiento de ARN total**

Se empleó muestras de veneno liofilizado de *B. atrox* y siguiendo el protocolo del fabricante TRIzol™ Reagent (Invitrogen): Se agregó 1ml de TRIzol a 40 mg de muestra y se homogenizó por 5 min. Después, se agregó 0,2 mL de cloroformo, se incubó a temperatura ambiente por 3 min y se centrifugó a 12.000xg por 15 min. Luego, se transfirió la fase acuosa a otro tubo, se agregó 0,5 mL de isopropanol, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000xg por 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con un 1ml de etanol al 75 %. De inmediato, se descartó el etanol y se secó el pellet por inversión. Finalmente, el ARN total fue resuspendido en 50 µL de agua ultra pura (Invitrogen) libre de

ARNasa y se dejó incubar en un AccuBlock Digital Dry Bath (Labnet) a 58°C por 15 min. La cuantificación se realizó en un equipo Nanodrop Lite Spectrofotometre (Thermo Scientific), para calcular la concentración y calidad del ARN total.

### **Síntesis de ADNc**

En la síntesis se siguió el protocolo del fabricante SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Se partió de 6,66 ng de ARN total, luego se agregó 400 ng de oligo (dT)<sup>18-20</sup>, 9,2 µL de agua miliQ, 1 µL de mix dNTPs 10 mM c/u. La mezcla se incubó a 65°C por 5 min y un 1 min en frío, se centrifugó brevemente y se agregó 4 µL de buffer First-Strand (5X), 1 µL de DTT 0.1 M, 1 µL de SuperScript™ III RT (200 units/ µL). Después, la mezcla se homogenizó y se incubó a 50°C por 45 min. Posteriormente, para la inactivación de la reacción se incubó a 70°C por 15 min. La cuantificación se realizó en un equipo Nanodrop Lite Spectrofotometre (Thermo Scientific), para calcular la concentración y calidad de ADNc.

### **Amplificación de la región codificante de la PLA2 ácida por PCR**

La amplificación del gen de la PLA2 por reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés (PCR) fue realizada en un termociclador Mastercycler (Eppendorf). La reacción tuvo 100 ng de ADNc, agua mili Q, dNTPs 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, tampón buffer con KCl 1X, 0.4 µM de cada cebador forward (5'-ATGAGGACTCTCTGGATAGTGA-3'), reverse (5'-TTAGCATGGCTCTGCCTTCT-3') y 0,3 µL de *Taq* Polimerase Recombinant (5 U/ µL). Las condiciones del amplificado fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, desnaturalización a 95°C por 40 seg, alineamiento a 54°C por 45 seg y extensión 72°C por 1 min, por 33 ciclos y extensión final a 72°C por 6 min. El producto de PCR fue corrido en un gel de agarosa (1,2 %) con buffer TBE 1X en un sistema de electroforesis (Cleaver Scientific Ltd), y el amplicón fue estimado con el Ladder GenRuler 100 pb DNA (Thermo scientific). Luego, el gel fue teñido con GelRed (0,01 %) y observado en un UV Transilluminator/microDoc (Cleaver Scientific Ltd). Los productos fueron secuenciados por EZ-Seq, realizado en la empresa Macrogen, Inc (Corea del Sur).

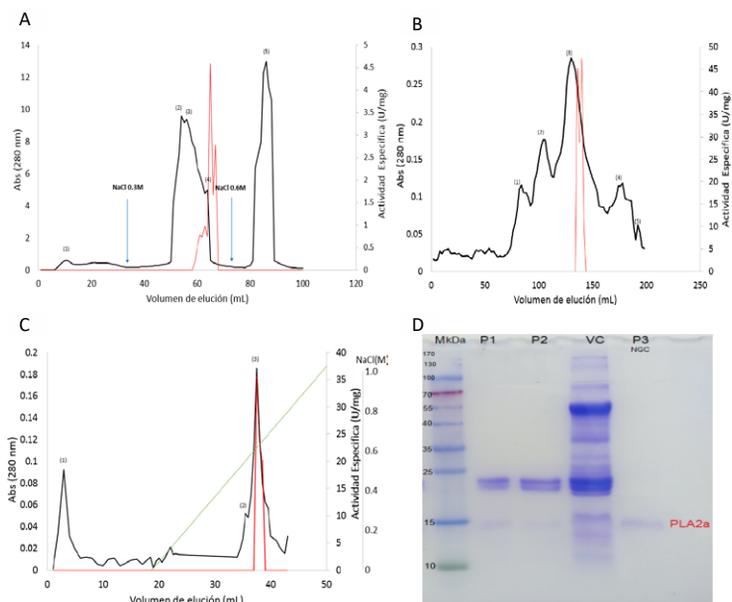
### **Análisis bioinformático**

Para la identificación de la secuencia obtenida se usó las bases de datos disponibles en *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *UniProt* (<https://www.uniprot.org/>) y para la identificación de estructuras homólogas se basó *Protein Date Bank* ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Se utilizó el programa (ClustalW) para alineamiento y generar la secuencia consenso de nucleótidos, de la cual se basó para obtener la estructura primaria de aminoácidos con *Translate tool* (<https://web.expasy.org/translate/>), Asimismo, se determinó el punto isoelectrico con el programa *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>). Por otro lado, también se emplearon los siguientes programas; *Robetta* ([new.rosetta.org](http://new.rosetta.org)) para el modelo comparativo, *Modeller* (<https://salilab.org/modeller/>) para la homología estructura y *PyMol*<sup>22</sup> para el modelamiento tridimensional de BaPer-PLA<sub>2a</sub>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Purificación y determinación del peso molecular de BaPer-PLA<sub>2a</sub>.

La presente enzima purificada denominada BaPer-PLA<sub>2a</sub> es la primera isoforma ácida en ser aislada del veneno de la especie *B. atrox* de Perú. En la primera etapa de purificación por intercambio aniónico, las proteínas fueron separadas por su carga. La enzima de interés eluyó después de adicionar NaCl 0,3 M, estando registrada en la caída del cuarto pico (figura 1A). El pool conteniéndola fue sometido a una segunda etapa de purificación por exclusión molecular, la cual permitió separar a la enzima por diferencia de pesos; la BaPer-PLA<sub>2a</sub> fue registrada en la caída del tercer pico (figura 1B). Posteriormente, se empleó el sistema cromatográfico automatizado de presión media -(NGC), empleando una gradiente de NaCl 0,1-1,0 M para separar a los contaminantes residuales, la cual permitió obtener a BaPer-PLA<sub>2a</sub> en el tercer pico (figura 1C), verificando que se encontró la enzima en el estado homogéneo, como lo indica en análisis por PADE-SDS (figura 1D). En la tabla 1 se muestra los procesos de purificación, en la primera etapa de purificación las unidades totales de actividad (UTA) se incrementaron en 37 % lo que indica la probable liberación de un inhibidor endógeno de dicha enzima. Finalmente, se logró obtener la enzima, a una purificación de 14,82 veces y un rendimiento de 3,39 %.



**Figura 1.** Cromatogramas de purificación. En (A) se muestra la primera etapa, la línea roja muestra la actividad enzimática específica. En (B) la segunda etapa, la actividad específica alcanza un valor de 45 (U/mg). En (C) la tercera etapa de purificación, en línea verde indica la gradiente de NaCl y la enzima en estudio se registra en el tercer pico, mientras que la línea roja indica la actividad específica de BaPer-PLA<sub>2a</sub> con un valor de 34,1 U/mg. En (D) Se muestra un PAGE-SDS, en condiciones no reductoras. P1 y P2 corresponden a muestras del segundo paso de purificación, en tanto que P3, después del paso por el sistema cromatográfico automatizado. Se llegó a obtener la proteína en su estado homogéneo, con peso de ~14,5 kDa. VC indica veneno total y (M) el marcador de peso molecular.

El uso combinado de sistemas cromatográficos ha sido la estrategia más eficaz para la purificación de las PLA<sub>2</sub> en especies tales como: la PLA<sub>2</sub> ácida en *B. pauloensis*<sup>1</sup> la PLA<sub>2</sub> básica miotóxica en *B. atrox*<sup>5</sup> y PLA<sub>2</sub> ácida en *B. moojeni*<sup>19</sup>.

El peso molecular de la enzima analizada por PAGE-SDS fue de ~14.5 KDa en condiciones no reductoras (figura 1D). Este resultado es compatible con otras PLA<sub>2</sub> ácidas como; en *B. pauloensis* (15kDa)<sup>1</sup>, en *B. moojeni* (15,8kDa)<sup>18</sup> y en *B. asper* (~14,5kDa)<sup>16</sup>. Por lo tanto, la enzima se trata de proteína de bajo peso molecular. Además, el tratamiento con β-mercaptoetanol sugiere que es monomérica, este resultado es compatible con otros trabajos<sup>1,14</sup>.

**Tabla 1.** Purificación de la enzima BaPer-PLA<sub>2a</sub> del veneno de *Bothrops atrox*.

Etapas	Proteína Total		A.E. (U/mg)	U.T.A.	Rendimiento %	Purificación
	mg	%				
Inicial: Veneno crudo	120	100	2,3	276	100	1
1° : DEAE-Sephadex A50	52,98	44,15	7,14	378,27	137	3,1
2° : Sephadex G75	3,709	3,09	16,34	60,6	21,96	7,1
3° : ENrichQ	0,275	0,229	34,1	9,377	3,39	14,82

A.E.: Actividad específica (U/mg de proteína), determinado por el método yema de huevo<sup>22</sup>

U.T.A: Unidades totales de actividad.

### Actividad enzimática de BaPer-PLA<sub>2a</sub>

La medición de la actividad enzimática se realizó usando la prolongación del tiempo de coagulación de emulsión de yema de huevo de Vidal y Stoppani<sup>21</sup>, en este caso se obtuvo una actividad específica de 34,1 U/mg lo que equivale a una purificación de 14,82 veces comparado con el veneno total (tabla 1). Esto se debió a la hidrólisis de los fosfolípidos a nivel del enlace éster n-2, liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos<sup>3,8</sup>.

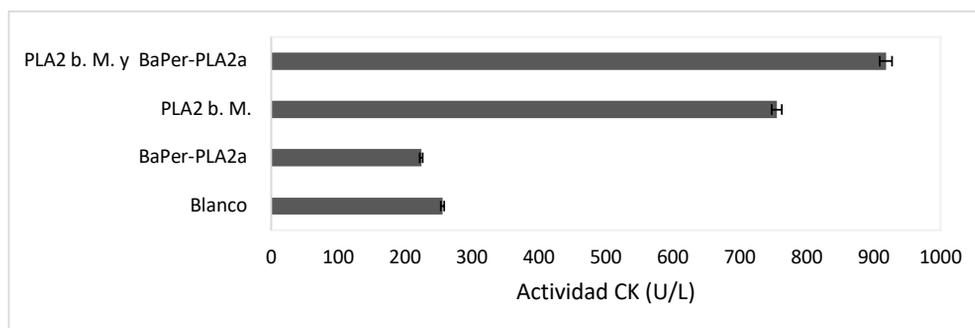
Si bien existen métodos más sensibles para medir la actividad de PLA<sub>2</sub>, el método de yema de huevo permitió hacer el seguimiento rápido de la enzima en cada etapa de purificación. Adicionalmente, se realizó la medición de actividad con el sustrato fosfatidilcolina de la enzima purificada, obteniendo una actividad de 179,6 U/mg.

Mucho se ha discutido acerca de la validez del método enzimático de prolongación del tiempo de coagulación de la yema de huevo ya que se trata de un sustrato heterogéneo. Sin embargo, el método es absolutamente idóneo para fines prácticos teniendo resultados reproducibles. Por otro lado, el método por espectrometría usado con el sustrato fosfatidilcolina tiene una alta sensibilidad, pero el procedimiento es laborioso en términos de aplicación, aunque se requiere pocas cantidades de enzima para el ensayo<sup>4,15</sup>.

### Actividad miotóxica de BaPer-PLA<sub>2a</sub>.

La enzima por sí sola no mostró actividad miotóxica al obtener valores iguales o menores al blanco durante la liberación de creatina quinasa (CK). Sin embargo, cuando es BaPer-PLA<sub>2a</sub> es combinada con la isoforma de PLA<sub>2</sub> básica miotóxica; el valor inicial de la isoforma de PLA<sub>2</sub> básica de 740 U/L $\pm$ 0,07, aumenta a 915 U/L  $\pm$  0,065, lo que equivale a un incremento del 21,58 % de la actividad miotóxica (figura 2). La carencia de actividad miotóxica de BaPer-PLA<sub>2a</sub> se ha reportado en otras isoformas ácidas del grupo II19, no obstante, también se ha reportado que la isoforma de PLA<sub>2</sub> ácida es capaz de producir una liberación alta o moderada de creatina quinasa (CK)<sup>1,16,18</sup>.

Un hecho relevante en esta investigación fue el hallazgo del incremento de la actividad miotóxica cuando se combinan las isoformas de PLA<sub>2</sub> ácida y básica, lo que sugiere que durante el envenenamiento podría ocurrir un incremento del daño al tejido muscular por acción sinérgica de ambas isoformas. Asimismo, esto abre un camino para intentar no sólo bloquear a la PLA<sub>2</sub> básica miotóxica, sino también a la enzima BaPer-PLA<sub>2a</sub>. Este resultado es compatible con lo reportado en la combinación de D49 y K49<sup>12</sup>.

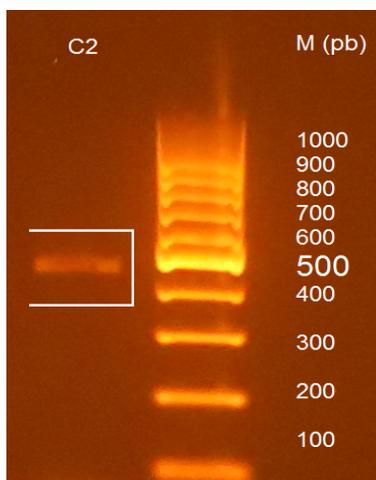


**Figura 2.** Actividad creatina quinasa (CK). La PLA<sub>2</sub> básica miotóxica (20  $\mu$ g/100  $\mu$ L), la BaPer-PLA<sub>2a</sub> (30  $\mu$ g/100  $\mu$ L), la combinación de PLA<sub>2</sub> básica miotóxica con BaPer-PLA<sub>2a</sub> (20  $\mu$ g + 5  $\mu$ g /100  $\mu$ L) y el blanco 100  $\mu$ L de solución salina.

### Aislamiento de ARN total, síntesis de ADNc y amplificación por PCR

De 40 mg de veneno liofilizado, se aisló 77 ng/ $\mu$ L de ARN total, por otro lado, a partir de 65 mg tejido glandular, se obtuvo 1282,4 ng/ $\mu$ L de ARN total. Las glándulas del veneno representan una fuente primaria para obtención de altas concentraciones de ARN total<sup>1,16</sup>. No obstante, esto implica el sacrificio del espécimen que para efectos de la presente investigación no es óptimo y atenta contra los principios de conservación de la especie.

Para la síntesis de ADNc se obtuvo 541 ng/ $\mu$ L, a partir de veneno liofilizado y 762,5 ng/ $\mu$ L de tejido glandular. Por otra parte, en la amplificación del gen de BaPer-PLA<sub>2a</sub> se obtuvo un producto de ~480 pb (figura 3), tamaño que es comparable a otros amplificadores de 448 pb en *L. muta*<sup>6</sup>, 417 pb de *B. pauloensis*<sup>1</sup> y de 414 pb en *B. moojeni*<sup>19</sup>.



**Figura 3.** Electroforesis en agarosa 1 %. En C2 se muestra en el cuadro en blanco el amplificado con un peso de ~ 480 pb. Siendo M el marcador en pares de bases (100-1000 pb).

#### **Análisis bioinformático de la BaPer-PLA<sub>2a</sub>.**

La estructura primaria de la enzima presenta 124 aminoácidos deducidos a partir de la secuencia de nucleótidos obtenida posterior a la amplificación. Los análisis por Blastp (NCBI) demostraron homología de la proteína deducidas con PLA<sub>2</sub> ácidas depositadas en esta base de datos. Posteriormente, el alineamiento múltiple con las PLA<sub>2</sub> ácidas de 11 especies del genero *Bothrops* mostró que la BaPer-PLA<sub>2a</sub> presenta una identidad entre 70-84 % con sus semejantes (figura 4). Asimismo, existe 83 % de identidad con la PLA<sub>2</sub> ácida de *B. asper* de Colombia, esto puede ser debido a la cercanía taxonómica entre ambas especies amazónicas. La BaPer-PLA<sub>2a</sub> presentan 14 aminoácidos cisteínas altamente conservados, las cuales formarían los siete enlaces disulfuro, mientras que los cuatro aminoácidos en las posiciones (Tyr28, Gly30, Gly32 y Asp49) formarían el loop de unión al calcio y un centro catalítico constituido por los residuos (His48, Asp49, Tyr52 y Asp99) (figura 4). Además, se dedujo su punto isoeléctrico (pI) teórico de 4,41.

Esto permitió concluir que se trata de una isoforma de PLA<sub>2</sub> ácida.

Estos resultados son similares a los reportados en *B. insulares*<sup>2</sup>, *B. asper*<sup>17</sup>, *B. pauloensis*<sup>1</sup> y *B. moojeni*<sup>18,19</sup>. Además, son regiones altamente conservadas en las fosfolipasas A<sub>2</sub> ácidas pertenecientes al grupo II de las serpientes de la familia Viperidae.

EL análisis bioinformático coloca en cercanía de congruencia de identidad a la secuencia proteica deducida con la proteína purificada en el presente trabajo, esto porque los cebadores fueron diseñados partiendo de la región conservadas de los UTR 5' y 3' de las secuencias de las PLA<sub>2</sub> ácidas con mayor cercanía taxonómica a la especie estudiada.

Accesión:				
BaPer-PLA2a	1	SLVAFEMMIMDMVRKNVFLYLSYGCYCGWGLGRPQDATDRCCFVHDC	GKVTDCDPKTDIYTYTYDN	70
Q8AXY1	1	SLWQFGKMINYVMGESGLVQLYSYGCYGLGGQGPDTDRCCFVHDC	GKVTGCDPKID--SYTYSK	68
Q8QG87	1	NLWQFGKLMNVMQGSVVKYFYGYCGWGGIGQPRDATDRCCFVHDC	GKVTGCDPKTD--SYTYSK	68
Q2HZ28	1	SLVQFETLIMKIAGRSVWVYGSYGCYCGSGGGRPQDASDRCCFVHDC	GKVTDCDPKAD--VYTYSE	68
G3DT18	1	NLWQFEMLIMKIAGTSGLFYSSYGCYCGWGHGRPQDATDRCCFVHDC	GKVTGCDPKTD--SYTYSE	68
C9DPL5	1	NLWQFGKLMKIAGESGVFKYLSYGCYGLGGQGPDTDRCCFVHDC	GKVTGCDPKID--SYTYSK	68
P86389	1	NLWQFGQMSDVMRKNVFKYLSYGCYCGWGGIGQPKDATDRCCFVHDC	GKVTGCDPKMDIYTYTYSK	70
P81243	1	DLWQFGQMMNDVMRYYVFNLYLYGCYCGWGGIGKPRDATDRCCFVHDC	GKVTGCDPKTDIYTYTYSE	70
Q918F8	1	SLVQFETLIMKIAGRSVWVYGSYGCYCGSGGGRPQDASDRCCFVHDC	GKVTDCDPKTD--IYTYSE	68
ATP66581	1	NLWQFEMMSDVMRKNVFKYLSYGCYCGWGLGRPQDATDRCCFVHDC	GKVTGCDPKTDIYTYTYSE	70
AGG39584	1	SLVQFDTLIMKIAGRSGLIFYSYGCYGLGGQGRPQDASDRCCFVHDC	GKVTGCDPKAD--VYTYSE	68
AFJ79208	1	NLWQFETLIMKIAGRSVWVYGSYGCYCGSGGGRPQDASDRCCFVHDC	GKVTGCDPKAD--IYTYSE	68
consensus	1	..*.*. ....* .***.* **.*.*.*****.*** * ..**..		

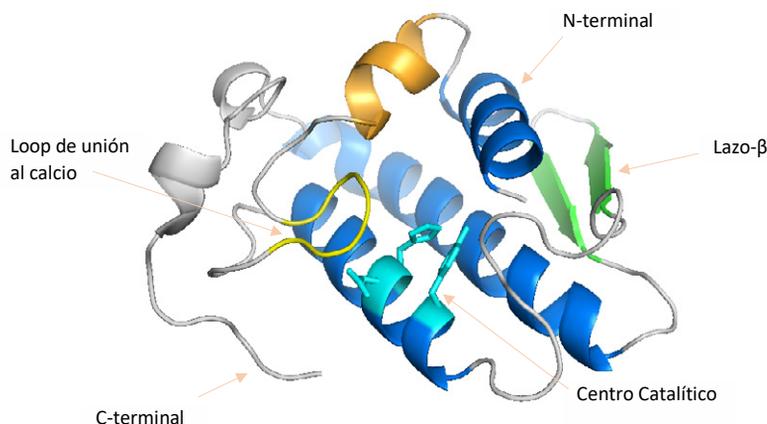
  

			Identidad	Especie
BaPer-PLA2a	71	ENGDVVCGGDDPCKKHICCDRVAATCFRDKDITYDSKYWFGAKNCQEESEPC	124	B. atrox
Q8AXY1	69	KNGDVVCGGDDPCKKRIQICECDRVAATCFRDKDITYDIKYWFGAKNCQEKSEPC	122	75.00% B. jararacussu
Q8QG87	69	ENGDVVCGGDDPCKKRIQICECDRVAATCFRDKDITYDMKYWLYGAKNCQEESEPC	122	75.00% B. insularis
Q2HZ28	69	ENGVVVCGGDDPCKKRIQICECDRVAATCFRDKDITYDNKYWFFPAKNCQEESEPC	122	75.00% B. erythromelas
G3DT18	69	ENGDVVCGGDDPCKKRIQICECDRVAATCFRDKDITYDNKYWFFPAKNCQEESEPC	122	77.42% B. moojeni
C9DPL5	69	ENGDVVCGGDDPCKKRIQICECDRVAATCFRDKDITYDIKYWFGAKNCQEESEPC	122	74.19% B. pirajai
P86389	71	ENGDVVCGGDDPCKKRIQICECDRVAATCFRDKDITYDSKYWFGAKNCQEDSEPC	124	81.45% B. asper
P81243	71	ENGDVVCGGDDPCKKRIQICECDRVAATCFRDKDITYDKYWLYGAKNCQEESEPC	124	78.05% B. jararaca
Q918F8	69	ENGVVVCGGDDPCKKRIQICECDRVAATCFRDKDITYDNKYWFFPANNCQEESEPC	122	75.00% B. pictus
ATP66581	71	ENGLVCGGDDPCKKRIQICECDRVAATCFRDKDITYDIKYWFGAKNCQEESEPC	124	83.06% B. asper
AGG39584	69	DNGDIVCGGDDPCKKRIQICECDRVAATCFRDKDITYDNKYWFFPAKNCQEESEPC	122	71.77% B. neuwiedi
AFJ79208	69	ENGVVVCGGDDPCKKRIQICECDRVAATCFRDKDITYDNKYWFFPAKNCQEESEPC	122	73.39% B. diporus
consensus	71	..*.*.*****.***.*****.****.***** *.....*****		

**Figura 4.** El alineamiento múltiple de la estructura primaria de BaPer-PLA<sub>2a</sub> con otras fosfolipasas A2 ácidas de varias serpientes del género *Bothrops*. Las accesiones de las proteínas se muestran en la primera columna. Se muestra el número de aminoácidos, porcentaje de identidad y la especie de origen. El aminoácido de cisteína se muestra en color gris. El loop para la unión al calcio se muestra en color amarillo, en tanto que los aminoácidos del centro catalítico se muestran en color rojo-cian.

### Modelamiento estructural de la BaPer-PLA<sub>2a</sub>

El modelamiento estructural se realizó en base a homología con las estructuras cristalizadas de la BthA-I-PLA2 de *B. Jararacussu*<sup>13,14</sup> (PDB: 1ZLB, 1U73 y 1UMV), los cuales tiene una identidad del 70-75 % con la BaPer-PLA2a empleando el programa Modeller y generado en el programa PyMol<sup>22</sup>. La estructura construida (figura 5) presenta tres  $\alpha$ -hélice, un lazo- $\beta$ , un loop para la unión al calcio y un centro catalítico (His48, Asp49, Tyr52 y Asp99)<sup>20</sup>. Además, este modelo también fue reproducido por otras investigaciones como la de BmooPLA2 en *B. moojeni*<sup>21</sup>.



**Figura 5.** Se muestra el modelo teórico estructural de la BaPer-PLA<sub>2a</sub> desarrollado por el programa PyMol<sup>23</sup>. En amarillo se indica el loop para la unión al calcio. En cian el centro catalítico. En verde se indica el lazo-β y en color azul las tres α-hélice.

## CONCLUSIONES

Esta investigación permitió purificar la primera isoforma ácida de PLA<sub>2</sub> (BaPer-PLA<sub>2a</sub>) a partir del veneno de la serpiente *B. atrox* que habita en la selva peruana. Posee actividad enzimática sobre lipoproteínas de yema de huevo y fosfatidilcolina, pero carece de actividad miotóxica. Su peso molecular fue de ~14,5 kDa en condiciones no reductoras y su pI (4,41), calculado *in silico*. La enzima incrementa la actividad miotóxica en 21,58 % de su homóloga PLA<sub>2</sub> básica, la cual es una miotoxina. Asimismo, se obtuvo una secuencia proteica deducida cercana a las características de la proteína purificada la cual pertenece al subgrupo (D49), presenta una estructura primaria de 124 aminoácidos, un centro catalítico formado por los residuos (His48, Asp49, Tyr52 y Asp99) y un loop para la unión al calcio. Finalmente, la enzima mostró una homología estructural teórica del 74,5 % con 1ZLB.

Por otro lado, la investigación demostró que la isoforma ácida potencia el efecto de miotoxicidad elevando los niveles de daño al tejido muscular, lo cual sugiere que es importante considerar a la BaPer-PLA<sub>2a</sub> durante el desarrollo de algún antiveneno, mientras que el análisis de la estructura primaria permitió, también, identificar regiones variables, las cuales podrían ser atribuidas al aumento de la miotoxicidad cuando se combinan con la isoforma básica. Finalmente, el modelo teórico estructural permitió una comprensión parcial de la enzima y dejando abierta la posibilidad de estudios posteriores.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a FONDECYT- CONCYTEC por el financiamiento otorgado a través del contrato N°168-2017-FONDECYT y a la UNMSM por las facilidades del laboratorio brindadas. Este trabajo es parte de la tesis de Magister en Biología Molecular del autor principal (Edwin Quispe Cerón). Se agradece al Bach. Alex Proleon por proporcionar gentilmente muestras de la isoforma de PLA<sub>2</sub> básica miotóxica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferreira FB, Gomes MS, de Souza DL, Gimenes SN, Castanheira LE, Borges MH, et al. Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA<sub>2</sub> from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxins (Basel)*. 2013; 5(12):2403-2419.
2. Cogo JC, Lilla S, Souza GH, Hyslop S, de Nucci G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *Biochimie*. 2006; 88(12):1947-1959.
3. Dennis EA, Cao J, Hsu Y-H, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem Rev*. 2011; 111(10):6130-6185.
4. Lazo F, Rodríguez E, Yarlequé A. Evaluación comparativa de dos métodos para determinar la actividad de fosfolipasa A en venenos de serpientes. *Rev Perú Biol*. 1998; 5(2):98-102
5. Huatuco S, Escobar E, Yarlequé A. Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). *Rev Perú Biol*. 2004; 11(1): 79-86
6. Jiménez K, Zavaleta A, Izaguirre V, Yarlequé A, Inga R. Clonaje y caracterización molecular *in silico* de un transcrito de fosfolipasa A<sub>2</sub> aislado del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2010; 27(4): 532-539.
7. Kohlhoff M, Borges MH, Yarlequé A, Cabezas C, Richardson M, Sánchez EF. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. *J Proteomics*. 2012; 75: 2181-2195
8. Kini MR. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Toxicon*. 2003; 42: 827-840.
9. Laemmli UK. Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 227: 680-685.
10. Lomonte B, Gutiérrez JM. Phospholipases A<sub>2</sub> From Viperidae Snake Venoms: How do They Induce Skeletal Muscle Damage? *Acta Chim Slov*. 2011;58: 647-659.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275.
12. Mora-Obando D, Fernández J, Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins of viperid snake venom *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*. 2014 Oct 7;9(10):e109846. doi: 10.1371/journal.pone.0109846.

13. Murakami MT, Gabdoulkhakov A, Genov N, Cintra ACO, Betzel C, Arni RR. Insights into metal ion binding in phospholipase A<sub>2</sub>: Ultra high-Resolution crystal Structures of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> in the Ca<sup>2+</sup> free and bound states. *Biochimie*. 2006; 88: 543-549.
14. Magro AJ, Murakami MT, Marcussi S, Soares AM, Arni RK, Fontes MR. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 323(1):24-31.
15. Oliveira MR, Palma MS. Polybiotoxins: a group of phospholipases A2 from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia Paulista*). *Toxicon*. 1998; 36(1): 189-199.
16. Posada Arias S, Rey-Suárez P, Pereáñez J A, Acosta C, Rojas M, Delazari Dos Santos L, et al. Isolation and Functional Characterization of an Acidic Myotoxic Phospholipase A<sub>2</sub> from Colombian *Bothrops asper* Venom. *Toxins (Basel)*. 2017;9(11). pii: E342. doi: 10.3390/toxins9110342.
17. Pantigoso C, Escobar E, Yarlequé A. Aislamiento y caracterización de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* Hoge, 1953 (Ophidia: Viperidae). *Rev Perú Biol*. 2001; 8(2): 106-148
18. Santos-Filho NA, Silveira LB, Oliveira CZ, Bernardes CP, Menaldo DL, Fuly AL, et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I<sub>2</sub> inductor phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. 2008; 52: 908-917.
19. Silveira LB, Marchi-Salvador DP, Santos-Filho NA, Silva FP Jr, Marcussi S, Fuly AL, et al. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A2 from *Bothrops moojeni* snake venom. *J Pharm Biomed Anal*. 2013; 73:35-43.
20. Scott DL, White SP, Otwinowski Z, Yuan W, Gelb MH, Sigler PB. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. *Science*. 1990; 250(4987):1541-1546.
21. Vidal JC, Stoppani AOM. Isolation and Purification of two Phospholipases A from *Bothrops* Venoms. *Arch Biochem Biophys*. 1971; 145: 543-556.
22. Delano WS. The PyMol, Molecular Graphics System. [Internet] Delano Scientific, San Carlos, CA. 2002. [Consultado mayo 2019]. Disponible en: <http://www.pymol.org>

## SELENIO TOTAL Y VIABILIDAD CELULAR EN LA OBTENCIÓN DE SELENIO-LEVADURA

\*Carmen Alicia Rodríguez Best<sup>a,c</sup>, Mario Ceroni Galloso<sup>a</sup>,  
Elvito Fabián Villegas Silva<sup>b</sup>, Teresa Dámaris Rebaza Cárdenas<sup>d</sup>

### RESUMEN

Se obtiene selenio-levadura mediante el cultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN Bourgovin RC 212 en el medio YEPD, con la adición de selenito de sodio (en concentraciones de 2 a 10 mg Se(IV)/L) durante la fase de crecimiento exponencial, después de 48 horas a 30°C y 200 rpm. La cuantificación de selenio total intracelular en la selenio-levadura es factible con el método espectrofotométrico almidón-yoduro a 590 nm y la adición de 8 mg Se(IV)/L proporciona mayor biomasa, una viabilidad celular superior al 90 %, coloración rosada y un contenido de selenio total intracelular de 738±30 mg/kg en base seca. Finalmente, la metodología utilizada para determinar el porcentaje de viabilidad celular y el método analítico propuesto para cuantificar el selenio total intracelular, son alternativas accesibles para el control del bioproceso.

**Palabras clave:** selenio total, selenio-levadura, selenito, viabilidad celular.

## TOTAL SELENIUM AND CELULAR VIABILITY FOR OBTAINING SELENIUM-YEAST

### ABSTRACT

Selenium-yeast is obtained by the culture of *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN Bourgovin RC 212 in the medium YEPD, with sodium selenite addition (concentrations of 2 to 10 mg Se(IV)/L) during exponential growth phase, after 48 hours at 30°C and 200 rpm. Total intracellular selenium quantification in the selenium-yeast is feasible with the starch-iodine spectrophotometric method at 590 nm and the addition of 8 mg Se(IV)/L yields the most biomass, a >90% cellular viability, pink coloration and a total intracellular selenium of 738±30 mg/kg in dry basis.

<sup>a</sup> Unidad de Posgrado de la Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 01

<sup>b</sup> Departamento Académico de Química. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima 12

<sup>c</sup> Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis. Departamento Académico de Química. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina. carb@la.molina.edu.pe

<sup>d</sup> Laboratorio de Micología y Biotecnología "Marcel Gutiérrez Correa". Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima 12.

Finally, the used methodology to find the cellular viability and the analytical method proposed to determine the total intracellular selenium are accessible for monitoring the bioprocess.

**Key words:** total selenium, selenium-yeast, selenite, cellular viability

## INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de cultivo al que se adiciona selenito (selenización), permite obtener suplementos dietarios de selenio-levadura que suministran selenio biológicamente disponible en forma segura. El selenio, elemento esencial para la nutrición humana y animal, puede ser naturalmente acumulado por la levadura, razón por la cual, se utilizan las células de levadura en la producción de alimentos e insumos en las industrias farmacéuticas y biotecnológicas<sup>1</sup>.

El proceso de incorporación de selenio involucra el control de factores como la cantidad de selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) o Se (IV) adicionado al medio de cultivo, la viabilidad celular de la biomasa<sup>2</sup> y la cantidad de selenio incorporado al medio intracelular de la levadura, entre otros<sup>3</sup>. Adicionalmente, otros investigadores<sup>4</sup> indican que al incrementar la cantidad de Se(IV) en el medio, se incrementa la inhibición del crecimiento celular de la levadura, lo que coincide con una mayor concentración de selenio total en las células de levadura.

Según Kieliszek *et al.*<sup>5</sup>, las especies de levadura pueden mostrar diferente tolerancia al selenio y el efecto inhibitorio del selenio sobre el crecimiento de los microorganismos puede basarse en la aparición de estrés oxidativo en las células de levadura. Estos investigadores explican que el selenio puede actuar como un factor fisiológico capaz de modificar el crecimiento de las células de levadura, por eso conocer su influencia en el crecimiento de la levadura puede contribuir a mejorar la producción de la biomasa enriquecida con selenio.

Aunque la medida de la densidad óptica es una forma rápida y fácil de estimar el crecimiento de la biomasa, determinar la viabilidad celular de la levadura es un ensayo accesible, que además permite estimar la condición de la población celular, pues una disminución en la viabilidad celular indica inhibición del crecimiento y la inducción de la respuesta al estrés<sup>6</sup>.

Respecto a la cuantificación del contenido de selenio total en muestras de selenio-levadura, generalmente, se realiza mediante una técnica espectrofotométrica o electroquímica, después de un proceso de digestión /disolución completa de la matriz<sup>7</sup>.

El objetivo en este trabajo es cultivar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con la adición de 2 a 10 mg Se(IV)/L al medio de cultivo, para obtener selenio-levadura, determinar espectrofotométricamente el selenio total intracelular y evaluar ese contenido respecto a la viabilidad celular de la biomasa, para suministrar métodos de cuantificación accesibles en el control del bioproceso.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material biológico

Levadura seca activa, Lalvin RC 212 (Bourgovin, GMO and gluten free). *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* producida por Lallemand INC. Montreal Qc, Canada HIW 2N8.

### Estándar

SELM-1 (material de referencia certificado de levadura enriquecida con selenio).

### Reactivos

Selenito de sodio P.A. (99 %) Panreac AppliChem; HCl Baker ACS (36,5-38 %), HNO<sub>3</sub>, HClO<sub>4</sub>, yoduro de potasio (99 %) Merck Emsure, Almidón soluble Scharlau.

### Equipos

Autoclave ALP modelo CLG-32L/40M/40L, cabina de bioseguridad Biobase modelo 11231BBC86 MSC Clase II, agitador orbital Thermo Scientific MAXQ 7000, espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Electron Corporation, pHmetro UB-10 Denver Instrument, microscopio Olympus modelo CX31RBSFA, cámara Neubauer- BOECO Germany, bright line, modelo Tiefe Depth. Profondeur (0.100 mm - 0.0025mm<sup>2</sup>), centrífuga Sorvall Legend Thermo Scientific, congeladora Frigidaire, espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Electron Corporation, espectrofotómetro 10 S Genesys.

### Metodología

#### Preparación del medio de cultivo

La preparación del medio de cultivo líquido YEPD (yeast extract, peptone, dextrose) y de la disolución de selenito de sodio (conteniendo 1000 mg Se(IV)/L), las condiciones de esterilización así como la medida del pH del medio de cultivo se realizaron según lo descrito por Rodríguez *et al.*<sup>2</sup>.

#### Preparación del inóculo

Se pesaron 0,011 g de levadura seca activa, LALVIN Bourgovin RC 212, que se adicionaron a 50 mL de YEPD estéril, en un matraz erlenmeyer de 250 mL. El matraz se colocó en baño maría a 36 ± 1°C durante 20 minutos, después se retiró, se mezcló el YEPD con la levadura y se continuó con la agitación a 30°C y 200 rpm durante 24 horas<sup>8</sup>.

#### Adición de selenito

En la cámara de bioseguridad, se adicionaron 5 mL de inóculo (cultivo de 24 horas de *Saccharomyces cerevisiae*, LALVIN Bourgovin RC 212 que contenía de 9,8x10<sup>7</sup> a 1,3x10<sup>8</sup> cel/mL)<sup>8</sup> a cada matraz erlenmeyer de 250 mL conteniendo 45 mL de medio líquido YEPD estéril. Después de inocular, los matraces debidamente acondicionados se colocaron en el agitador a 30°C y 200 rpm. Transcurridas 5 horas de crecimiento (fase de crecimiento exponencial), se agregaron volúmenes de disolución de selenito de sodio en todos los medios experimentales, excepto en uno (control), con el propósito de obtener concentraciones de 0 (control), 2, 4, 6, 8 y 10 mg Se(IV)/L. Posteriormente, se continuó la agitación de todos ellos a 30°C y 200 rpm hasta completar 48 horas de cultivo. Se realizaron cuatro repeticiones.

### Densidad óptica y viabilidad celular

Se realizaron cuatro repeticiones de las mediciones de densidad óptica (DO) y de recuento celular, la DO se realizó a 600 nm y el recuento celular con tinción<sup>2</sup> para cada una de las concentraciones de Se(IV)/L a las 48 horas.

La viabilidad celular alcanzada en los cultivos se calcula como % de viabilidad celular = [(número de células viables / mL ÷ número de células totales / mL) x 100].

### Recuperación de biomasa de levadura

Los cultivos de levadura en la fase estacionaria (48 horas) se colocaron en tubos falcón de 50 mL de capacidad, luego se separó la biomasa de levadura del sobrenadante (medio de cultivo) mediante centrifugación a 4°C y 4000 x g rpm durante 10 minutos<sup>9</sup>. Después de la separación, la biomasa de levadura recuperada se colocó a -20°C.

### Preparación de estándares

En la preparación directa de estándares de selenio, se pesaron 0,0139 gramos de selenito de sodio, se llevaron a 2 mL con agua ultrapura y a partir de esa disolución se obtuvieron por dilución disoluciones estándar de 100 y 20 mg Se(IV)/L, respectivamente. También se realizaron adiciones de selenito de sodio a levadura sin selenio de la siguiente forma: a 0,0137 gramos de selenito de sodio se adicionaron 0,0400 g de levadura seca, luego se agregaron 20 µL de agua ultrapura, 150 µL de HClO<sub>4</sub> (70 % p/p) y 50 µL de HNO<sub>3</sub> (54 %p/p), se sometieron a calentamiento moderado, luego se agregaron 50 µL de HCl 6M y nuevamente se calentó, enfrió y neutralizó en frío con 100 µL de NaOH 6M para llevar a un volumen de 2 mL. Después se agitó, centrifugó y el residuo se resuspendió con 1,5 mL de agua ultrapura. A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones de 100 y 20 mg Se(IV)/L, para proseguir con el procedimiento general de determinación espectrofotométrica de selenio total.

Para el análisis del material de referencia certificado SELM-1, se pesaron 0,0600-0,0800 g, se agregaron 40 µL de agua ultrapura, 300 µL de HClO<sub>4</sub> (70%p/p) y 100 µL de HNO<sub>3</sub> (54%p/p), se sometieron a calentamiento moderado, luego se agregaron 100 µL de HCl 6M se calentó, enfrió y neutralizó en frío con 200 µL de NaOH 6M para llevar a un volumen de 4 mL, luego se mezcló, centrifugó y el residuo se resuspendió en 3,0 mL de agua ultrapura. Después se realizó el procedimiento general de la determinación espectrofotométrica<sup>8</sup>.

### Preparación de muestra de selenio-levadura

Se pesaron 0,200 g de biomasa de selenio-levadura en suspensión (conservada a -20°C), luego se realizó el lavado con 2 mL de agua ultrapura, se mezcló en el vortex, posteriormente se aplicó ultrasonido (20 kHz por un minuto), se centrifugó a 3500 rpm por cinco minutos y se eliminó el sobrenadante. Al sedimento se adicionaron 150 µL de HClO<sub>4</sub> (70 % p/p) y 50 µL de HNO<sub>3</sub> (54 % p/p), se sometieron a calentamiento, después se agregaron 50 µL de HCl 6M se calentaron, enfriaron y neutralizaron en frío con 100 µL de NaOH 6M completando a 1,5 mL con agua destilada, se agitó, centrifugó y el residuo se resuspendió en 1,5 mL de agua ultrapura, se midieron 300 µL de la solución y a continuación se realizó la determinación espectrofotométrica de selenio total<sup>8</sup>.

### Determinación espectrofotométrica de selenio total

La determinación espectrofotométrica almidón-yoduro de selenio total intracelular de selenio-levadura se fundamentó en la siguiente yodometría:  $(\text{SeO}_3)^{2-} + 2\text{I}^- + 6\text{H}^+ \rightarrow \text{Se}^0 + \text{I}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$ .

El procedimiento general consistió en medir un volumen de estándar o de muestra al que se adicionaron 5 mL de almidón al 0,1 % (p/v), 0,5 mL de EDTA al 5 % (p/v), 0,5 mL de KI al 2 % (p/v) y 0,5 mL de HCl 6M, luego se dejaron reaccionar durante 10 minutos, se completó con agua destilada hasta 10 mL, se homogeneizó y se realizó la medida de absorbancia a 590 nm antes de transcurridos 15 minutos<sup>8</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Densidad óptica y viabilidad celular

Las medidas de densidad óptica y porcentaje de viabilidad celular de la levadura, después de 48 horas de cultivo en el medio YEPD (pH 6), a las concentraciones de Se(IV) evaluadas, se encuentran en la tabla 1 donde se aprecia que los valores de DO, así como los de viabilidad celular, disminuyen conforme es mayor el contenido de Se(IV) en el medio de cultivo. También se observa que la magnitud de las disminuciones son más evidentes en los valores de viabilidad celular, a partir de la adición de 6 mg Se(IV)/L, lo que sugiere que probablemente se produce mayor inhibición del crecimiento a las concentraciones de 8 y 10 mg Se(IV)/L, considerando que las adiciones se realizaron en todos los casos durante la fase de crecimiento exponencial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN Bourgovin RC 212.

**Tabla 1.** DO y Viabilidad celular de la selenio-levadura a las 48 horas de cultivo.

Se(IV) adicionado (mg/L)	DO	Viabilidad celular (%)
0	2,084	99,4
2	2,032	99,3
4	1,978	99,2
6	1,959	99,4
8	1,952	93,6
10	1,863	87,3

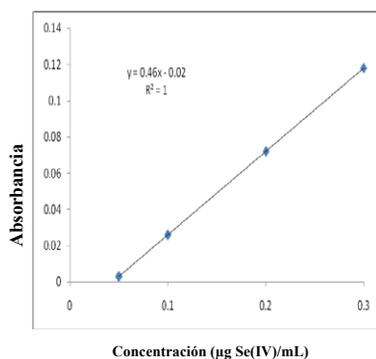
### Determinación espectrofotométrica de selenio total

En la figura 1 se encuentra la curva estándar para concentraciones de 0 a 0,3 mg Se(IV)/L, la ecuación es  $y=0,46x - 0,02$  y el  $R^2 = 1$ ; mientras que la curva estándar para el rango de concentraciones entre 0 a 1,2 mg Se(IV)/L tiene la ecuación  $y=0,411x - 0,012$  y un  $R^2=0,999$ , como se observa en la figura 2.

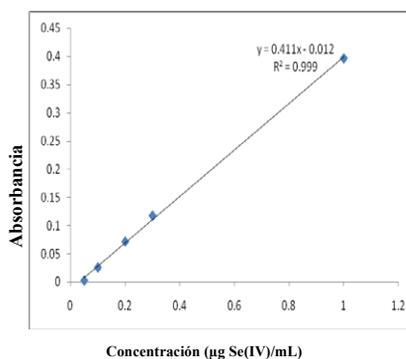
Respecto a las recuperaciones para los estándares de selenito de sodio, se obtuvieron valores de  $99,98 \pm 0,10$  % para 20 mg Se(IV)/L y  $99,99 \pm 0,08$  % para 100 mg Se(IV)/L, mientras que

en los estándares preparados con adición de selenito de sodio a la levadura seca (sin selenio), se alcanzaron menores recuperaciones,  $99,87 \pm 0,15$  % para el estándar de 20 mg Se(IV)/L y  $99,90 \pm 0,11$  % para el estándar de 100 mg Se(IV)/L.

En general, las altas recuperaciones obtenidas se explican por el cuidadoso proceso de digestión ácida o mineralización desarrollado, para lograr la oxidación completa de la materia orgánica, la oxidación completa a Se(VI) y luego la reducción a Se(IV).



**Figura 1.** Curva estándar para selenio por el método almidón-yoduro a 590 nm. Concentraciones de 0 a 0,3 µg Se(IV)/mL.



**Figura 2.** Curva estándar para selenio por el método almidón-yoduro a 590 nm. Concentraciones de 0 a 1,2 µg Se(IV)/mL.

El resultado del análisis de selenio total ( $n=3$ ) para el material de referencia certificado (MRC) de levadura selenizada, SELM-1, es de  $2010 \pm 50$  mg Se/kg en base seca, lo que representa el  $99,01 \pm 0,25$  % de recuperación, respecto al valor certificado de  $2031 \pm 70$  mg Se/kg en base seca. Este resultado indica el buen desempeño del método espectrofotométrico almidón-yoduro a 590 nm en la cuantificación de selenio total en el SELM-1.

### Selenio total en selenio-levadura

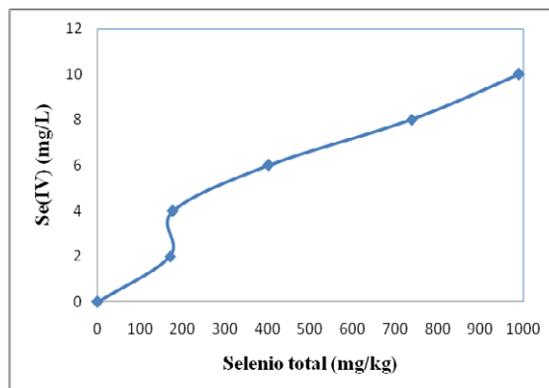
Las muestras de biomasa de selenio-levadura mantienen su morfología celular después de tres lavados con agua ultrapura y aplicación de ultrasonido, lo que representa una alternativa para eliminar Se(IV) extracelular remanente de la pared celular de la levadura.

La etapa de digestión ácida o mineralización de las muestra de selenio-levadura en suspensión requiere un procedimiento cuidadoso y progresivo, pues el ácido perclórico no es un oxidante en disolución acuosa, debido a que forma una mezcla azeotrópica con el agua, que hierve a  $170^\circ\text{C}$ , temperatura a la cual es un oxidante poderoso y rápido<sup>10</sup>, lo que implica que primero se deben eliminar los vapores nitrosos, luego proseguir con la acción del ácido perclórico hasta oxidación total del selenio intracelular a Se(VI) y luego la reducción cuantitativa a Se(IV) con la adición de ácido clorhídrico<sup>11</sup>.

Los resultados de selenio total en el medio intracelular de las muestras de levadura control y selenizadas, provenientes de los crecimientos a las diferentes concentraciones de Se(IV), se observan en la tabla 2, donde se aprecia que la cantidad de selenio total intracelular se incrementa conforme es mayor la cantidad de Se(IV) adicionado al cultivo, a partir de 4 y en mayor magnitud para 6, 8 y 10 mg Se(IV)/L (figura 3) tal como indican Ponce *et al.*<sup>4</sup>.

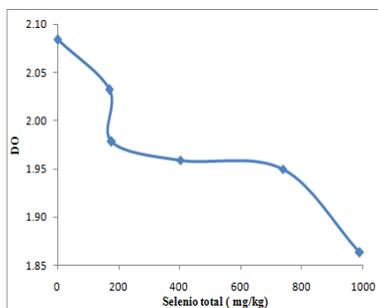
**Tabla 2.** Selenio total intracelular en selenio-levadura.

Se(IV) adicionado (mg/L)	Selenio total (mg/kg)
0	0,2
2	170 ± 8
4	177 ± 8
6	402 ± 17
8	738 ± 30
10	990 ± 65

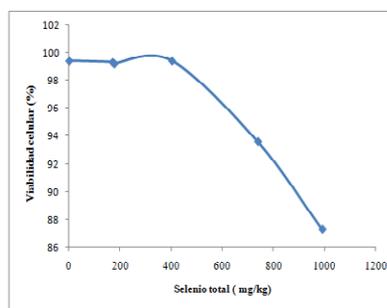


**Figura 3.** Selenio total intracelular en selenio-levadura en función de la adición de Se(IV).

Además, en la figura 4 se observa que a menores valores de DO corresponden mayores contenidos de selenio total intracelular, tendencia que también se aprecia para el porcentaje de viabilidad celular en la figura 5. Al comparar ambas tendencias, con las mismas adiciones de Se(IV) al medio de cultivo de la levadura (tabla 2), se encuentra que los valores de DO son cercanos a 2,10 y la viabilidad celular cercana al 100 % cuando la cantidad de selenio total es menor a 200 mg/kg de selenio total intracelular. Sin embargo, para concentraciones superiores a 400 mg/kg de selenio total intracelular, los valores del porcentaje de viabilidad celular descienden más drásticamente que los de DO, lo que implica que la levadura ha incorporado selenio mediante sus procesos metabólicos, con la consiguiente conversión a formas orgánicas de selenio, aunque también es probable que mayores concentraciones de selenio total intracelular se manifiestan en estrés oxidativo<sup>5</sup> que coincide con la inhibición del crecimiento y acumulación de selenio elemental.



**Figura 4.** Selenio total y DO de las muestras de selenio-levadura.



**Figura 5.** Selenio total y viabilidad celular de las muestras de selenio-levadura.

La incorporación de selenio descrita coincide con lo reportado por Kieliszek *et al.*<sup>9</sup>, respecto a que un menor tiempo de exposición y baja concentración de Se(IV) en el medio de cultivo es el método más efectivo para evitar la acumulación de selenio en la biomasa de levadura.

Por otro lado, las adiciones de selenito al YEPD en concentraciones de 8 y 10 mg Se(IV)/L, durante la fase de crecimiento exponencial de la levadura, producen mayor biomasa cuando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN Bourgovin RC 212 se cultiva a 30°C y 200 rpm durante 48 horas, aunque el porcentaje de viabilidad celular es de 93,6 % y 87,3 %, respectivamente, con una biomasa con coloración rosada en ambos casos, lo es un indicativo de un nivel intermedio de acumulación de selenio<sup>3</sup>.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a las evidencias disponibles, cultivar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN Bourgovin RC 212 en el medio YEPD, adicionando selenito de sodio a las 5 horas de la inoculación (fase de crecimiento exponencial), a concentraciones entre 2 y 10 mg Se(IV)/L, en las condiciones descritas, permite obtener selenio-levadura. Además, es factible la cuantificación de selenio total intracelular mediante el método espectrofotométrico almidón-yoduro a 590 nm, aplicado luego de un proceso de digestión ácida.

Finalmente, las metodologías utilizadas para determinar el porcentaje de viabilidad celular y el contenido de selenio total intracelular, son alternativas accesibles, que suministran información sobre la inhibición del crecimiento y la acumulación de selenio en la levadura, para el control del bioproceso.

## AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento a la Ph.D. Gretty Villena Chávez, Directora del Laboratorio de Micología y Biotecnología “Marcel Gutiérrez Correa”, por las facilidades brindadas para la ejecución de ensayos de recuento de levaduras. Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Agraria La Molina, en el marco del Convenio MINEDU–UNALM 2017, por el financiamiento otorgado para el desarrollo de la presente investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kieliszek M, Blazejak S, Gientka L, Bzducha-Wrobel A. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015; 99: 5373-5382.
2. Rodríguez C, Cjuno J, Ceroni M. Influencia de la concentración de Se(IV) en la viabilidad celular durante el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Soc Quim Perú.* 2018; 84(2): 228-238.
3. Marinescu G, Stoicescu AG. Industrial nutrient medium use for yeast selenium preparation. *An Univ "Dunarea Jos" Galati Fasc VI.* 2011; 35(1):45-53.
4. Ponce de León CA, Bayón MM, Paquin C, Caruso JA. Selenium incorporation into *Saccharomyces* cells: a study of different incorporation methods. *J Appl Microbiol.* 2002; 92:602-610.
5. Kieliszek M, Blazejak S, Bzducha-Wróbel A, Kot AM. Effect of selenium on growth and antioxidative system of yeast cells. *Mol Biol Rep.* 2019; 46(2):1797-1808. doi: 10.1007/s11033-019-04630-z
6. Jamnik P, Raspor P. Methods for Monitoring Oxidative stress Response in Yeasts. *J. Biochem Mol Toxicol.* 2005; 19 (4): 195-203.
7. Ochsenkuhn–Petropoulou M, Tsopelas F. Speciation Analysis Especially of Tin and Seleniun in Environmental Matrices. En Michalke B. *Metallomics: Analytical Techniques and Speciation Method.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2016. P. 131-151.
8. Rodríguez Best CA. Cuantificación cromatográfica y electrométrica de selenometionina y selenocisteína intracelular de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en función de la concentración de selenito en el medio de cultivo. [Tesis doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019.
9. Kieliszek M, Blazejak S, Placzek M. Spectrophotometric evaluation of selenium binding by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC MYA-2200 and *Candida utilis* ATCC9950 yeast. *J Trace Elem Med Biol.* 2016; 35:90-96.
10. Feigl F, Anger V. Pruebas a la Gota en Análisis Inorgánico. México D.F.: El Manual Moderno; 1980.
11. Svarc-Gajic' JV, Suturović ZJ, Marjanovic NJ, Kravic Z. Chronopotentiometric Stripping Analysis of Selenium in Feed: Development of a Method. *Asian J Anim Vet Adv.* 2006; 1(1):13-22.

## INFORMACIONES

### CONCURSO SUBVENCIÓN DE MEMBRESÍA A ACS Y SQP DURANTE EL AÑO 2020

Gracias a la iniciativa del Dr. Luis Echegoyen, Presidente de la American Chemical Society (ACS) y a la Sociedad Química del Perú (SQP) se convoca a los jóvenes científicos de los dos últimos años de las carreras profesionales Química, Ingeniería Química y Química-Farmacéutica así como a los estudiantes de las maestrías y doctorados correspondientes a esas carreras profesionales al concurso subvención de membresía a ambas instituciones científicas durante todo el año 2020.

La ACS y SQP ofrecen un total de 20 subvenciones a los jóvenes científicos peruanos que cubre los gastos de membresía durante todo el año 2020. Los beneficios de tales membresías pueden verse en: <https://www.acs.org/content/acs/en/membership/memberbenefits.html> y <http://sqperu.org.pe/beneficios/>

El presente concurso tiene como objetivo enriquecer la red de contactos, tener acceso a revistas científicas, obtener grandes descuentos en la asistencia a congresos, entre otros beneficios para los jóvenes científicos peruanos relacionados con la ciencia química.

Los postulantes deben ser estudiantes con buen rendimiento académico de los dos últimos años de las carreras profesionales Química, Ingeniería Química y Química-Farmacéutica, así como de las maestrías y doctorados correspondientes. Para postular deben enviar escaneado el carnet o constancia de estudiante universitario, DNI y CV resumido a [sqperu@gmail.com](mailto:sqperu@gmail.com) (poner en asunto: concurso subvención de membresía).

El CV resumido debe incluir el promedio de notas, si está realizando investigación poner el título y nombre del asesor, datos de tesis y publicaciones realizadas, el nombre, correo y celular de un docente de su universidad como referencia, así como otros datos relevantes académicos.

### FECHAS IMPORTANTES

30 de diciembre de 2019 al	
30 de enero 2020	Postulación y envío de datos a <a href="mailto:sqperu@gmail.com">sqperu@gmail.com</a>
15 de enero 2020	Primer corte.
18 de enero 2020	Publicación de los ganadores de la subvención del primer corte.
30 de enero 2020	Segundo corte.
03 de febrero 2020	Publicación de los ganadores de la subvención del segundo corte.

En caso se completa las 20 subvenciones en el primer corte, el segundo corte quedará anulado. Por ello, se insta a postular antes del primer corte.

**XXX CONGRESO PERUANO DE QUÍMICA**  
**“Dra. Olga Lock Sing de Ugaz”**  
**I CONGRESO IBERO LATINOAMERICANO DE NANOTECNOLOGÍA,**  
**NANOCIENCIAS Y APLICACIONES**  
**“Dra. Catalina Ruiz Pérez”**

La Sociedad Química del Perú inicia la organización y los invita a participar en el **XXX CONGRESO PERUANO DE QUÍMICA “DRA. OLGA LOCK SING DE UGAZ” - I CONGRESO IBERO/LATINOAMERICANO DE NANOTECNOLOGÍA, NANOCIENCIAS Y APLICACIONES “DRA. CATALINA RUIZ PÉREZ”** que se llevarán a cabo entre los días 14 al 16 de octubre 2020 en los ambientes del Colegio de Ingenieros del Perú en la ciudad de Lima.

La Sociedad Química del Perú, con 87 años de creación, es una institución científica sin fines de lucro que agrupa a todos aquellos que tienen como ideal común el cultivo de las ciencias químicas y que tiene como objetivos promover y difundir el conocimiento científico, fomentar la investigación, la innovación y la tecnología en las diferentes ramas de la química.

**DIRIGIDO A**

Profesionales y alumnos universitarios, químicos, ingenieros químicos, químicos farmacéuticos, bioquímicos, biólogos, ingenieros industriales, ingenieros en industrias alimentarias, ingenieros ambientalistas, ingenieros agroindustriales, ingenieros metalurgistas, agrónomos, médicos y otros profesionales afines a la ciencia química.

**INDICE DE MATERIAS**  
**Rev. Soc. Quím. Perú**  
**Vol. 85 – Año 2019**

- 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 Berrospi. 175
- Análisis proximal y cuantificación de antocianinas totales en maíz morado sometido a diferentes procesos de secado, por Valle Campos Manuel, García Ceccarelli Jorge, Laos Anchante Doris, Yarasca Carlos Eliades, Loyola Gonzales Eddie, Surco-Laos Felipe 109
- Aplicación de voltamperometría de redisolución anódica para la determinación de antimonio, por Hugo Italo Romero-Bonilla, Thalía Gabriela Vera-Infante, Felipe Fernando Redrovan- Pesantez, Jennifer del Cisne Jumbo-Sari, Freddis Franco Pesantez 293
- 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
- Caracterización bioquímica, biológica y molecular del factor difusor presente en el veneno de la serpiente *Bothrops atrox* “JERGÓN”, por Julio Delgadillo, Dan Vivas, Edith Rodríguez, Fanny Lazo, E.F. Sánchez y Armando Yarlequé. 141
- Caracterización físico-química, microscópica de barrido y dispersión de rayos X del mucílago de cladodios de *Opuntia ficus indica* en la región alta de Tacna, por Juan José Vargas Mamani, Gabriela Victoria Vera Vargas, Nicole Andrea Suppé Tejada. 305
- Catalizadores basados en Ru-Fe soportados sobre TiO<sub>2</sub> para la hidrogenación de palmitato de metilo con obtención de alcohol cetílico, por Pieer Rodriguez, Enrique Neira, Rosario Sun Kou, Gino Picasso. 389
- 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
- Efecto de la inclusión de diferentes fuentes lipídicas en la dieta de engorde sobre el perfil de ácidos grasos poliinsaturados en filete de paco *Piaractus brachypomus*, por Wilfredo Vásquez Quispesivana, Raúl Porturas Olaechea, Fredy Crispin Sanchez 305

- Efecto de la temperatura de sustrato sobre la estructura y resistividad eléctrica de películas delgadas de nitruro de molibdeno, por José Noé Valdivia Rodas, Arturo Fernando Talledo Coronado, Segundo Jáuregui Rosas, Pedro De La Cruz Rodríguez, Manuel Enrique Guevara Vera. 406
- 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
- Estabilización de la bosta de caballo mediante un proceso aeróbico similar al compostaje, por Lena A. Tellez Monzón, Luis F. Ortiz Dongo, José L. Calle Maraví, Paola A. Jorge Montalvo, Mary F. Cesaré Coral, Lizardo Visitación Figueroa. 25
- Estudio comparativo del contenido de compuestos bioactivos y cianidina-3-glucósido del maíz morado (*Zea mays* L.) de tres regiones del Perú, por Ana María Ccaccya Ccaccya, Mercedes Soberón Lozano e Inés Arnao Salas. 206
- Estudio de la biodegradación de residuos de aceite lubricante retenidos en bentonita usando el consorcio bacteriano oil eating microbes (*Rodhococcus*, *Pseudomonas* y *Bacillus*), por Jaqueline Chirre Flores, Alejandro Patiño Gabriel y Raymundo Erazo Erazo. 163
- Estudio preliminar de la composición nutricional del hongo *Pleurotus ostreatus* cultivado en pulpa de café, por Jessica I. Nieto-Juárez, Ángel D. Cuzcano-Ruiz, Walter A. Reyes-López. 422
- 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. 249
- Estudio teórico del plasmón en nanoesferas de oro, por Ana María Osorio Anaya, Joaquín J. Manrique Fajardo, Óscar Cornejo Sánchez. 432
- Evaluación biológica de proteína, vitaminas, minerales y aminoácidos del alga comestible *Ulva lactuca* “lechuga de mar” del litoral peruano, por Liliana Sumarriva Bustinza, Américo Castro Luna, Alejandrina Sotelo Méndez, Nadia Chávez Sumarriva. 34
- Evaluación de la adsorción del carbón obtenido del mesocarpio de cacao (*Theobroma cacao* L.) modificado por ultrasonido, por Diego Suárez Ramos y Elvito Villegas. 216

- Evaluación de la calidad del destilado alcohólico de anís verde (*Pimpinella anisum* L.) obtenido por destilación fraccionada, por Clesez Tunqui Quispe, Alexia Pardo Figueroa Dianderas, Gustavo Tejada Flores e Ivette del Rosario Cjuro Farfán. 129
- Evaluación de la vida útil de los aceites de Sacha Inchi (*Plukenetia huayllabambana* y *Plukenetia volubilis*) microencapsulados, por Rafael Alarcón Rivera, María del Carmen Pérez Camino, Nancy Chasquibol Silva. 327
- Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de sanky (*Corryocactus brevistylus*), por Tatiana Rojas, María E. Fuentes Campos, Eliana Contreras-López, Susana Gomez y Ana María Muñoz-Jáuregui. 258
- Influencia del pH en la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) a partir de un hidrogel a base de  $\beta$ -Quitosano, por Sthefanie Cabrel Rengifo, Graciela Untiveros Bermúdez, José Luis Aguilar Olano. 440
- Lixiviación de plata a temperatura alta en mineral complejo de piritita, por Américo Suazo Ramos Hurtado 69
- Modelos de migración del plomo de dos envases celulósicos en contacto con simulante de alimentos, por Gerson Martín Cabrejos Hurtado, Walter Francisco Salas Valerio. 452
- Nanoemulsiones O/W de aceite esencial de naranja y tween 80, por George Alvarado López y Esperanza Medina Lezama. 189
- Obtención y caracterización del nanocomposito: nanopartículas de plata y carboximetilquitosano (NPsAg-CMQ), por Julia Lilians Zea-Alvarez, María Elena Talavera-Núñez, Carlos Arenas-Chávez, David Pacheco Salazar, Ana María Osorio Anaya, Corina Vera Gonzales. 14
- Optimización de la remoción simultánea de nitrato, nitrito, amonio y fosfato de aguas residuales municipales, por Jerson Chuquimboques Marrero, Jorge Vergara Rojas, Jorge Mendoza Bobadilla. 85
- Preparación de catalizadores basados en vanadil fosfatos de Fe soportados sobre  $\gamma$  -  $Al_2O_3$  para la deshidrogenación oxidativa del etano, por Ivan Baldeón, Rosario Sun-Kou, Gino Picasso. 69
- Preparación y caracterización de biosorbentes basados en compósitos de MWCNT-Magnetita-Hidroxiapatita y su potencial aplicación en la remoción de metales pesados, por Golfer Muedas Taipe, Andrea Leticia Almandoz Landa, Fátima Amanda Santillán Espinoza. 463

- Pretratamiento e hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz, por Yasmin Castillo García, Juan Juscamaita Morales, Paola A. Jorge Montalvo, Lizardo Visitación Figueroa. 476
- Producción de electricidad empleando acidithiobacillus ferrooxidans a partir de iones tiosulfato y férrico, por Sandro Jibaja, Vanessa Oyola, Arturo Berastain, Daniel Ramos, Elisa Roncal, Juan Carlos Medina, Graciela Untiveros, Patricia Sheen, Jasmín Hurtado. 3
- Producción y caracterización química de biochar a partir de residuos orgánicos avícolas, por Enmer Trujillo A., Christian Eduardo Valencia A., María Cecilia Alegría A., Alejandrina Honorata Sotelo M., Mary Flor Césare C. 489
- Propiedades fisicoquímicas, funcionales y estructurales de almidones nativos y acetilados obtenidos a partir de la papa (*Solanum tuberosum*) var. 'única', por Patricia Martínez, Fiorela Peña, Yelena Gómez, Guino Vargas, Carmen Velezmoro 338
- Purificación y algunas propiedades bioquímicas y moleculares de una nueva fosfolipasa A2 no miotóxica del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*, por Edwin Quispe, Daniel Torrejon, Lorgio Bautista, Gustavo Sandoval, Edith Rodriguez, Fanny Lazo, Dan vivas-Ruiz y Armando Yarleque. 505
- Remoción de Lignina en el pretratamiento de cascarilla de arroz por explosión con vapor, por Ricardo Aaron Naveda Rengifo, Paola Aurelia Jorge Montalvo, Lisveth Flores del Pino, Lizardo Visitación Figueroa. 352
- Remoción de materia orgánica en reactor anaerobio de manto de lodos de flujo ascendente en el tratamiento de aguas residuales del camal de Huancavelica, por Jerson Castro Olarte, Yon Cecilio Cabrera, Teresa Jesús Gonzales Huamán, Liliana Sumarriva Bustinza 362
- Selenio total y viabilidad celular en la obtención de selenio-levadura, por Carmen Alicia Rodríguez Best, Mario Ceroni Galloso, Elvito Fabián Villegas Silva, Teresa Dámaris Rebaza Cárdenas. 216
- Tratamiento electroquímico de una emulsión acuosa de ácido palmítico empleando un electrodo de fieltro grafitico modificado con hierro, por Ángel G. Castro, Maynard J. Kong. 43
- Tratamiento por declorinación in situ de bifenilos policlorados (PCBs), para control de riesgos de salud de los trabajadores y el medio ambiente en el sector minero del departamento de Pasco, por Jessica Muñoz Hermitaño. 58

## INDICE DE AUTORES

**Rev. Soc. Quím. Perú**

**Vol. 85 – Año 2019**

Aguilar O., José L.	440	De La Cruz R., Pedro	406
Alarcón R., Rafael	327	Delgadillo, Julio	141
Alata M., Evelin	231	Erazo E., Raymundo	163
Alegría A., María C.	489	Flores R., Eduardo	175
Alejandro P., Gabriel	163	Flores, Lisveth	351
Almandoz L., Andrea L.	463	Franco P., Freddis	293
Alvarado L., George	189	Fuentes C., María E.	258
Anaya F., Oscar G.	153	García C., Jorge	109
Arenas Ch., Carlos	14	García, Williams	242
Arnao S., Inés	206	Giraldo B., Mariel	175
Baldeón, Ivan	69	Gomez, Susana	258
Bautista, Lorgio	505	Gómez, Yelena	338
Berastain, Arturo	3	Gonzales H., Teresa J.	361
Cabrejos H., Gerson M.	452	Guerrero V., Tania E.	153
Cabrel R., Sthefanie	440	Guevara V., Manuel E.	406
Cabrera, Yon C.	361	Hurtado, Jasmín	3
Calle M., José L.	25	Ingaroca, Sharon	268
Castillo G., Yasmín	476	Jáuregui R., Segundo	406
Castro L., Américo	34	Jibaja, Sandro	3
Castro O., Jerson	361	Jorge M., Paola A.	25, 351
Castro, Américo	268	Jumbo S., Jennifer	293
Castro, Ángel G.	43	Juscamaita M., Juan	476
Ccaccya C., Ana M.	206	Kong, Maynard J.	43
Ceroni G., Mario		Laos A., Doris	109
Césare C., Mary F.	25, 489	Lazo, Fanny	141, 505
Chasquibol S., Nancy	327	Lezama, Helmer	242
Chávez S., Nadia	34	Loyola G., Eddie	109
Chirre F., Jaqueline	163	Manrique F., Joaquín J.	432
Chuquimboques M., Jerson	85	Martínez, Patricia	338
Cjuro F., Ivette	129	Medina L., Esperanza	189
Contreras L., Eliana	258	Medina, Esperanza	231
Cornejo S., Óscar	432	Medina, Juan C.	3
Crispín S., Fredy	315	Mendoza B., Jorge	85
Cuadros H., Yuri	231	Miranda Z., Luis	231
Cuzcano R., Ángel D.	422	Muedas T., Golfer	463

Muñoz H., Jessica	58	Sotelo M., Alejandrina H.	489
Muñoz J., Ana M.	258	Sotelo M., Alejandrina	34
Naveda R., Ricardo A.	351	Suárez R., Diego	216
Neira, Enrique	389	Sumarriva B., Liliana	34, 361
Nieto J., Jessica I.	422	Sun K, Rosario	69, 389
Orcon B., Beatriz	175		
Ortiz D., Luis F.	25	Suppé T., Nicole A.	305
Osorio A., Ana M.	14, 432	Surco L., Felipe	109
Oyola, Vanessa	3	Talavera N., María E.	14
Pacheco S., David	14	Talledo C., Arturo F.	406
		Tejada F., Gustavo	129
Pardo Figueroa D., Alexia	129		
Peña, Fiorela	338	Tellez M., Lena A.	25
Pérez Camino, María	327	Torrejon, Daniel	505
Picasso, Gino	69, 389	Trujillo A., Enmer	489
Porturas O., Raul	315	Tunqui Q., Clesez	129
		Untiveros B., Graciela	3, 440
Pumachagua, Rodolfo	242		
Quispe, Edwin	505	Valdivia R., José N.	406
Ramos H., Américo S.	97	Valencia A., Christian E.	489
Ramos, Daniel	3	Valle C., Manuel	109
Ramos, Norma	268	Vargas M., Juan J.	305
		Vargas, Guino	338
Rebaza C., Teresa D.	518		
Redrovan P., Felipe F.	293	Vásquez Q., Wilfredo	315
Reyes L., Walter A.	422	Velezmoro, Carmen	338
Rodríguez B., Carmen A.	518	Vera G., Corina	14
Rodríguez, Edith	141, 505	Vera I., Thalía G.	293
		Vera V., Gabriela V.	305
Rodriguez, Pieer	389		
Rojas, Tatiana	258	Vergara R., Jorge	85
Romero B., Hugo I.	293	Villegas S., Elvito F.	216, 518
Roncal, Elisa	3	Visitación F., Lizardo	25, 351,
Salas V., Walter F.	452	476	
		Vivas R., Dan	141, 505
Sánchez, E.F.	141	Yarasca C., Eliades	109
Sandoval, Gustavo	505		
Santillán E., Fátima A.	463	Yarlequé, Armando	141, 505
Sheen, Patricia	3	Ynca B., Anthony	175
Soberón L., Mercedes	206	Zea A., Julia L.	14



**XXX CONGRESO PERUANO DE QUÍMICA**  
**“Dra. Olga Lock Sing de Ugaz”**  
**I CONGRESO IBERO LATINOAMERICANO DE NANOTECNOLOGÍA,**  
**NANOCIENCIAS Y APLICACIONES**  
**“Dra. Catalina Ruiz Pérez”**  
**Del 14 al 16 de octubre 2020**