

ISSN 1810-634X

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 86 N° 2
ABRIL - JUNIO - 2020



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

La Rosa Toro Gómez, Adolfo
Universidad Nacional de Ingeniería

Areche Medina, Carlos
Universidad de Chile

Quintana, María
Universidad Nacional de Ingeniería

Cedrón, Juan Carlos
Universidad De la Laguna - España

Rueda, Juan Carlos
Pontificia Universidad Católica del Perú

Celestino Baldeón, Wilfredo
Universidad Nacional Agraria La Molina

Ruiz Quiroz, Julio
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Gómez Valdez, Badhin
Universidad Católica de Santa María

Santiago Contreras, Julio
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Gonzáles Gil, Patricia
Pontificia Universidad Católica del Perú

Meza Contreras, Víctor
Universidad Nacional Agraria La Molina

Hernández Gorriti, Wilfredo
Universidad de Lima

Vargas De la Cruz, Celia
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Kong, Maynard
Pontificia Universidad Católica del Perú

Revista indizada en el Chemical Abstracts, SciELO y Latindex

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

Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú

Teléfono (511) 960 189 928

e-mail: sqperu@gmail.com

Portal web: www.sqperu.org.pe

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

Certificado N° 95-1567

Vol 86

ABRIL - JUNIO 2020

N° 2

En el Perú: N° suelto S/.15

Suscripción anual: S/. 60.00

En el extranjero: Suscripción anual: \$50.00

SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ
CONSEJO DIRECTIVO
(marzo 2020 – marzo 2022)

Presidente	: Mg. Helmer Helí Lezama Vigo
Vice-Presidente	: Mg. Neptalí Ale Borja
Tesorero	: Dr. Juan Manuel Parreño Tipián
Secretaria	: Lic. Nora Emperatriz Alvino De la Sota
Director Administrativo	: Ing. Patricio Eudes Muñoz Huillcas
Vocales	: Quím. Rodolfo Pumachagua Huertas Mg. Norma Amparo Cuizano Vargas Dr. Fernando Carlos Carrasco Solís Mg. Nora Gabriela Herrera Hernández Mg. Mario Antonio Bolarte Arteaga Mg. Max Jorge Carlos Salazar

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. 86 – N° 2 – 2020)

Editorial	91
------------------------	----

Trabajos Originales

- Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> de los extractos acuosos de los frutos de <i>Hylocereus megalanthus</i> y <i>Passiflora tripartita</i> var. <i>Mollissima</i> sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, por Erick Raul Coral Caycho, María Rosario Calixto Cotos, María Mercedes Soberón Lozano	93
- Contribución al estudio fitoquímico de los tubérculos de <i>Ullucus tuberosus</i> caldas, por Ingrit Elida Collantes Díaz y Elena Alicia Córdor Cuyubamba	105
- Contribución al estudio fitoquímico del zumo de <i>Colignonia parviflora</i> subsp. <i>Biumbellata</i> (saqta), por Juan Carlos Chipayo Auccapuma, Jessica Ivana Nieto Juárez, Ingrit Elida Collantes Díaz	112
- Determinación de polifenoles totales y actividad antioxidante de extracto de semillas de uvas residuos de la producción de piscos, por Felipe Surco-Laos, Hilda Ayquipa Paucar, Wilfredo Quispe Gamboa, Jorge García Ceccarelli, Manuel Valle Campos	123
- Estudio de la coagulación de partículas coloidales de AgI por influencia de quitosano con sulfato de aluminio, por Miguel Allcca Chullca, Nelson Tapia Huananbal, Claudia Villanueva Huerta, Enrique Guzmán Lezama, Patricio Muñoz Huillicas, Neptalí Ale Borja, Holger Maldonado García	132
- Estudio químico del aceite esencial de la “yareta” <i>Smalanthus parviceps</i> (Blake) Rob, por Gianella Neves Ordóñez, Marisol Fernández Ruiz, Sugia Solís Miranda, Nino Castro Mandujano, Carlos Serrano Flores	143
- Evaluación de la estabilidad de un digester anaerobio termófilo, por Edson Morales Ch.	152
- Evaluación del nivel contaminante de ocratoxina a (Ota) mediante columnas de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta eficiencia en <i>Coffea arabica</i> L. “Café”, por Félix Hugo Milla Flores, Américo Castro Luna	164
- Funcionalización del gel de polisiloxano con nanopartículas de plata y su caracterización, por Rosa Aída Balvín Beltrán, Julia Lilians Zea Álvarez, Corina Vera Gonzales, Luis De Los Santos Valladares, María Elena Talavera Núñez	175
- Optimización de la producción de fructooligosacáridos a partir del extracto de algarrobo utilizando fructosiltransferasas, por Carmen Peña-Suasnabar, Amparo Iris Zavaleta	192

Revista Arbitrada

Derechos reservados: Prohibido el uso total o parcial del material de esta revista sin indicar la fuente de origen.
Nota: Las referencias comerciales que aparecen en los trabajos no constituyen una recomendación de la Sociedad Química del Perú.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La Revista de la Sociedad Química del Perú publica trabajos originales e inéditos de carácter científico, tecnológico y técnico en el campo de las ciencias químicas. La Revista acepta preferentemente los trabajos que expresen resultados valiosos, producto de las investigaciones científicas básicas o aplicadas, así como, los de divulgación que, por su importancia y la claridad de su exposición, constituyan un material valioso para la comunidad científica y tecnológica.

La Revista, en formato impreso o electrónico, está dividida en las siguientes secciones: artículos de investigación, comunicaciones cortas, cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y divulgación.

Los trabajos son recibidos por el Comité Editorial, quien revisará cumplan con las “Instrucciones para los autores”, la ortografía y redacción (incluida la puntuación). A continuación pasa a la Comisión de Publicaciones y Árbitros para que se pronuncien sobre el contenido científico. Si existen observaciones se comunicará al autor corresponsal para que se proceda a levantar dichas observaciones.

Los artículos de investigación son el resultado de un trabajo experimental o teórico, producto de una investigación científica o tecnológica, que aporta un nuevo conocimiento. Se recomienda una extensión entre 10 a 15 páginas a espacio y medio.

Las comunicaciones cortas son trabajos cuya extensión no debe ser mayor a 4 páginas a espacio simple, escritas bajo las mismas características que un artículo de investigación. Están referidos a trabajos cortos concluidos, pero en los que hay urgencia en su publicación.

Las cartas al editor son comunicaciones que brindan la oportunidad para discutir, criticar o ampliar algunos puntos sobre los trabajos publicados en la Revista. Su extensión no debe exceder una hoja a espacio simple.

Los trabajos de revisión se basan en recopilaciones bibliográficas de temas en los que el autor tiene amplia experiencia. La Comisión de Publicaciones encomendará estos trabajos a especialistas en la materia.

Los artículos de enseñanza de la química son aquellos que proporcionan, en especial a los profesores y alumnos, una nueva visión, interpretación o aclaran los conceptos, teorías o experimentos químicos. Los requisitos que deben tener son: originalidad, importancia pedagógica, relevancia y claridad.

Las notas informativas corresponden a temas que no están relacionados a una investigación, pero son artículos que merecen ser divulgados, por ser de gran interés para la comunidad química.

Los autores de los trabajos publicados son los únicos responsables de la autenticidad y opiniones expresadas en los mismos. Todos los autores de un artículo deberán firmar una carta de presentación del trabajo como garantía de haber participado activamente en la investigación y redacción del artículo. Todas las comunicaciones entre la Comisión de Publicaciones y el autor corresponsal se realizarán vía correo electrónico. El autor corresponsal deberá responder los correos electrónicos en el plazo que se señale.

Los autores enviarán sus artículos impresos y en formato electrónico (disco compacto o al correo electrónico sqperu@gmail.com) a la Comisión de Publicaciones, junto con una carta dirigida al editor y abonarán 30 soles por concepto de gastos administrativos, como adelanto del pago de la publicación, no reembolsables.

La publicación de cada trabajo está sujeta al pago de las siguientes sumas:

Cuando todos los autores son socios: S/. 120,00

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

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

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

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

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

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

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

The publication of each work is subject to payment of the following ones:

When all the authors are partners of the Peruvian Chemical Society: S/. 120,00

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

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

If the authors reside abroad US \$ 110,00

When the number of authors is superior at 3 it will be paid, also, US \$ 15,00 for each author in excess.

Formato para los artículos

Baje la plantilla de artículo. Los autores pueden solicitar la plantilla de artículo al correo electrónico sqperu@gmail.com

1. El texto completo, debe ser escrito en formato Microsoft Word, tamaño de página A4. Márgenes; izquierdo 3 cm, derecho 3 cm, superior 3 cm, inferior 3cm. Espacio 1½, fuente Times New Roman, estilo de fuente regular (salvo indicación contraria), color de fuente negro (texto y gráficos) y tamaño de fuente 12. Se imprimirá de manera vertical. Todo el texto, excepto el título, debe estar alineado a la derecha y a la izquierda (usar la opción “justificar”). Los decimales deben llevar coma.
2. Los idiomas de publicación son español e inglés.
3. El título del trabajo, que debe ser **breve y claro**, en español y en inglés (este último antes del abstract) se escribe con tamaño de fuente 16, centrado y en negritas. Los nombres completos de los autores aparecerán a continuación con tamaño de fuente 12, el autor corresponsal se identificará con un asterisco. Las instituciones de la cual proceden los autores se escriben con tamaño de fuente 10 e irán a pie de página, donde también sólo el autor corresponsal colocará su correo electrónico después de la dirección postal completa de su institución.
4. Se presentarán dos resúmenes, uno en español y otro en inglés (Abstract), con una extensión aproximada entre 50 y 200 palabras. Las palabras Resumen y Abstract se escriben con tamaño de fuente 14, centrado y en negrita. Además, después del Resumen se deberá incluir entre 3 y 6 palabras clave, en español. Tanto Palabras clave como Key words se escriben a la izquierda del texto, con tamaño de fuente 12 y en negrita.).
5. Deberá respetarse las normas internacionales referentes a la nomenclatura, símbolos y sistemas de medida. Los nombres científicos de género y especie van en cursiva (itálica).
6. El caso de artículos originales y comunicaciones cortas, el texto debe contener las siguientes secciones: Introducción, Parte Experimental, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias. Éstas se escriben con tamaño de fuente 14, en negritas y centradas. Las cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y notas informativas, tendrán las secciones que el autor crea más conveniente.
7. Las tablas, figuras y esquemas, que no deben ser mayores que una página A4, tienen numeración arábica seguido de punto. A continuación se coloca la leyenda que explique su significado. La numeración y leyenda en una tabla, cuyo formato debe ser básico 1, se colocan en la parte superior a diferencia de las figuras y los esquemas que se ubican en la parte inferior. Las figuras deben ser originales y de alta resolución.
8. Las tablas, fotos, figuras y esquemas deben estar incluidos en el documento de Microsoft Word.
9. Las referencias, se citan en el texto correlativamente como superíndice. El número de estas referencias no debe ser excesivo. Deberían fluctuar entre 7 y 15. La sección Referencias se escribe con tamaño de fuente 14, centrado y en **negrita**. Las abreviaturas de la revistas se escribirán según el Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) y *List of Journals Indexed in Index Medicus*, (<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html>) Las referencias citadas se escribirán con el tamaño de fuente 10 y se seguirá el estilo de Vancouver.

Editorial

Riesgo en la manipulación y consumo del dióxido de cloro y clorito de sodio

En la actualidad, en todos los países, se observa que algunas personas inducen el uso de todo tipo de sustancias y preparados con tal de prevenir o tratarse del COVID-19 y en su desesperación algunos consumen e incluso se inyectan sustancias químicas peligrosas, lo cual es sumamente preocupante.

Siendo el mercado informal de nuestro país algo normal, la venta de diversos productos químicos por las redes sociales se ha vuelto cotidiano. Aparte de las medicinas, muchas de ellas adulteradas -que sin recetas médicas se compran por la Internet- hay tres compuestos peligrosos que se venden sin control por personas no autorizadas y sin pericia en el manejo de sustancias peligrosas y además los manipulan temerariamente, ellos son: clorito de sodio, dióxido de cloro y ácido clorhídrico.

El dióxido de cloro es un gas amarillo rojizo que fue descubierto por Sir Humphrey Davy en 1814 y se comercializa desde los años 20 del siglo pasado como desinfectante. Se trata de un oxidante muy fuerte, muy reactivo e inestable que incluso puede explotar. Si bien es soluble en agua se descompone por fotólisis, generando especies como el radical hipoclorito, ácido cloroso y ácido clórico que luego se descomponen. Se conoce que reacciona violentamente con mercurio, fósforo, azufre, entre otras sustancias, lo cual es un peligro porque podría originar fuego y explosión. El dióxido de cloro es una sustancia corrosiva cuya inhalación causa tos, dolor de garganta, dificultad respiratoria, entre otros daños. En contacto con la piel causa desde enrojecimiento hasta quemaduras cutáneas graves.

Para preparar el dióxido de cloro el personal capacitado y autorizado lo obtiene al reaccionar clorito de sodio con ácido clorhídrico para su uso como desinfectante. El clorito fue observado primero por N.A.E. Millon en 1843, pero fue investigado mucho más por G. Bruni y G.R Levi en la primera y segunda década del siglo pasado. Este compuesto tiene riesgo de incendio y explosión. Su inhalación causa dolor de garganta y tos y en contacto con la piel causa enrojecimiento y dolor. Al ser una sustancia fuertemente oxidante reacciona violentamente con muchos reductores, en especial combustibles.

Como uno de los usos del dióxido de cloro es en el tratamiento de agua, la EPA (Environmental Protection Agency) ha establecido niveles máximos de presencia de clorito en agua potable de 1 mg/L y para el dióxido de cloro de 0,8 mg/L. Asimismo, los trabajadores que usan este compuesto como desinfectante saben que el límite de exposición ocupacional al dióxido de cloro para una jornada de 8 horas diarias, 40 horas por semana, es de 0,1 partes por millón (0,3 miligramos por metro cúbico [mg/m³]).

Toda sustancia de uso médico debe pasar por un control de calidad. Un mercado informal de insumos no garantiza la calidad de los mismos en cuanto a su pureza o presencia de contaminantes. Como el clorito de sodio lo venden como desinfectante, se desconoce su

pureza y nadie sabe cuáles son sus contaminantes. Asimismo, siendo el ácido clorhídrico una sustancia sujeta a registro, control y fiscalización algunas personas, de manera ilegal, en el Perú la venden desconociéndose además su calidad.

Los usos supuestamente médicos del dióxido de cloro y su venta se iniciaron en Estados Unidos en el 2006, donde sin ningún sustento clínico algunos de los vendedores indicaban que curaba la malaria, luego incorporaron el autismo, ébola, gripe H1N1, cáncer, etcétera. Tras un tiempo, su venta se trasladó a Europa y a otros continentes. Ahora, en tiempo de pandemia, sus promotores dicen, sin prueba alguna, que cura el COVID-19.

Una revisión crítica en las publicaciones relacionadas con el dióxido de cloro indica que muchos son estudios químicos, biológicos y toxicológicos; la mayoría son estudios preclínicos. Como se sabe, para que una sustancia sea aprobada con fines medicinales se debe cumplir con los estudios clínicos de las fases I, II y III, tras lo cual se derivan a instituciones como la FDA, que tras exhaustiva revisión la aprueban o desaprueban. A la fecha no existe ningún documento que acredite que haya pasado estas fases el dióxido de cloro. En vista de ello, y de los peligros de intoxicación que ocasiona este compuesto, ningún organismo de salud ha aprobado el uso del dióxido de cloro con fines médicos; es más, vetan su uso y alertan a la población de los problemas de salud causados por este compuesto.

Cuando la histeria social induce a las personas a consumir sustancias muy peligrosas para la salud es bueno recordar que en el año 1667 se publicó el libro *History of the Royal Society* encargado a Thomas Sprat y supervisado por R. Boyle y J. Wilkins, que en un párrafo señala “la actividad científica consiste en recoger los hechos de la naturaleza, absteniéndose de recoger teorías generales que se “anticipen” a ellos, huyendo de los sistemas dogmáticos generales, de la retórica, las sutilezas dialécticas y la fantasía, buscando a cambio la aplicación útil”. Sabias palabras que siglos después recobran importancia en tiempos de coronavirus.

Dr. Mario Ceroni Galloso
Miembro de la SQP

ACTIVIDAD INHIBITORIA *in vitro* DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE LOS FRUTOS DE *Hylocereus megalanthus* Y *Passiflora tripartita* var. *mollisima* SOBRE LAS ENZIMAS α -AMILASA Y α -GLUCOSIDASA

Erick Raúl Coral Caycho^a, María Rosario Calixto Cotos^b,
María Mercedes Soberón Lozano^c

RESUMEN

La pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y el tumbo serrano (*Passiflora tripartita* var. *mollisima*) son frutos cultivados en Perú. El objetivo de este estudio fue evaluar la propiedad hipoglucemiante de estos frutos mediante la inhibición *in vitro* de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. Los frutos fueron despulpados y liofilizados, y luego de preparar los respectivos extractos acuosos, se determinó el contenido de polifenoles totales (TPC) mediante el método de Folin-Ciocalteu. La actividad inhibitoria se determinó mediante el IC_{50} y se evaluó el tipo de inhibición utilizando 0,25-2 mg/mL y 0,02-0,28 mg/mL del extracto del tumbo serrano sobre la α -amilasa y α -glucosidasa, respectivamente. Para la pitahaya se empleó 4-64 mg/ml y 0,8-25,6 mg/mL sobre la α -amilasa y α -glucosidasa, respectivamente. Los TPC para el tumbo serrano y pitahaya amarilla fueron de 614,67 y 16,17 mg/100 g de muestra, respectivamente, expresados en equivalente de ácido gálico. El extracto acuoso de tumbo serrano inhibió a las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa (tipo no competitiva mixta) con un IC_{50} de 1719,18 y 77,68 μ g/ML, respectivamente, mientras que la pitahaya amarilla solo inhibió a la enzima α -glucosidasa con un IC_{50} de 8692,4 μ g/mL (tipo competitiva).

Palabras clave: *Hylocereus megalanthus*, *Passiflora tripartita* var. *mollisima*, inhibición enzimática, α -amilasa, α -glucosidasa.

^a Facultad de Odontología, Unidad de Posgrado-Maestría en Bioquímica UNMSM. Av. Germán Amézaga N° 375 – Ciudad Universitaria, Cercado de Lima, Lima, Perú. erickcoral11@gmail.com

^b Facultad de Química e Ingeniería Química, UNMSM, Ciudad Universitaria, Av. Venezuela. Lima-Perú.

^c Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Medicina. UNMSM. Av. Grau 755. Lima 1, Perú.

***In vitro* INHIBITORY ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF FRUITS OF *Hylocereus megalanthus* AND *Passiflora tripartita* var. *mollisima* ON α -AMYLASE AND α -GLUCOSIDASE ENZYMES**

ABSTRACT

“Pitahaya amarilla” (*Hylocereus megalanthus*) and “tumbo serrano” (*Passiflora tripartita* var. *mollisima*) two fruits that grow in Peru. The aim of this study was to evaluate the hypoglycemic activity by in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase enzymes. The fruits were pulped and lyophilized, and after the obtaining of aqueous extracts, the total phenolic content (TPC) was determined by the Folin-Ciocalteu method. Inhibitory activity was determined by IC₅₀, and the type of inhibition was evaluated using 0,25-2 mg/mL and 0,02-0,28 mg/mL of the extract of tumbo serrano for α -amylase and α -glucosidase, respectively. For pitahaya amarilla, 4-64 mg/mL and 0,8-25,6 mg/mL were used for each enzyme, respectively. The TPC for the tumbo serrano and pitahaya amarilla were 614,67 and 16,17 mg/100 g of sample, respectively, expressed as gallic acid equivalents. The aqueous extract of tumbo serrano inhibited the α -amylase and α -glucosidase (mixed non-competitive type) with an IC₅₀ of 1719,18 and 77,68 μ g/mL for each enzyme, respectively, while pitahaya amarilla only inhibited the α -glucosidase with an IC₅₀ of 8692,4 μ g/mL (competitive type).

Key words: *Hylocereus megalanthus*, *Passiflora tripartita* var. *mollisima*, enzymatic inhibition, α - amylase, α - glucosidase.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que se caracteriza por presentar niveles altos de glucosa, originando como consecuencia de ellos trastornos en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas¹. Hasta el año 2014, en el Perú, existía una prevalencia de 6,7% de personas, de 18 años de edad a más, con DM, de los cuales el tipo II es el más frecuente, constituyendo el 90 al 95% de los diabéticos. En este tipo de diabetes se observa un defecto progresivo en la producción de la insulina, así como una insulinoresistencia principalmente en hígado y músculo lo que conlleva a niveles altos de glucosa en sangre². Estos niveles altos ocasionan un daño oxidativo en varios tejidos y órganos del cuerpo debido a la ruptura del equilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (EROS) y los sistemas de defensa antioxidante³.

En el Perú existe una gran variedad de plantas, a las cuales se les atribuyen distintas propiedades, que son empleadas por los pobladores para tratar distintas enfermedades. Entre ellas están el tumbo serrano (*Passiflora tripartita* var. *mollisima*) y la pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) que crecen entre los 1100 a 3500 msnm. A ellas se les designan propiedades antiinflamatoria, antioxidante e hipoglicemiente, lo cual podría ser explicado por el contenido de compuestos fenólicos⁴.

Loizzo *et al.*⁵, en el 2019, identificaron los compuestos fenólicos presentes en el fruto del tumbo serrano, encontrando valores altos de catequinas y ácido sinapínico. De igual manera, la presencia de antioxidantes naturales, como las betalainas, han sido encontrados en la cáscara y pulpa de frutos de distintas especies de *Hylocereus*⁶.

Se han reportado estudios donde los compuestos fenólicos (por ejemplo el ácido cafeico y ácido p-cumárico), presentes en algunas plantas, poseen efecto hipoglicemiente al inhibir enzimas que participan en la digestión de carbohidratos, como por ejemplo la α -amilasa y α -glucosidasa que juegan un papel importante en la digestión y que están relacionadas con el aumento de glucosa en el estado postprandial⁷. El tumbo serrano y la pitahaya amarilla, que según referencias contienen una considerable cantidad de polifenoles, podrían ser considerados alimentos con provecho terapéutico para los pacientes con diabetes.

Teniendo en cuenta la importancia de los compuestos fenólicos presentes en las plantas, el propósito de este estudio fue observar la posible actividad y modo inhibitorio de los extractos acuosos de los frutos mencionados sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa con el fin de verificar su posible uso como tratamiento adyuvante a los fármacos usados en la DM.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

Los reactivos α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, α -amilasa de páncreas porcino, 4-nitrofenil α -D-glucopiranosido (pNPG), ácido 3,5 dinitrosalicílico, acarbose y la D-(+)-Maltosa monohidratada fueron adquiridos de Sigma - Aldrich.

Material vegetal

Los frutos del *Passiflora tripartita* var. *mollisima* (tumbo serrano) fueron recolectados en la provincia de Andahuaylas, departamento de Apurímac (2926 msnm), mientras los frutos de la *Hylocereus megalanthus* (pitahaya amarilla) fueron recolectados en la provincia de San Ignacio, departamento de Cajamarca (1324 msnm). Las dos plantas fueron identificadas en el herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El tumbo serrano, con constancia N° 226-USM-2019, fue determinado por el Mg. Asunción A. Cano Echevarría y la pitahaya amarilla, con constancia N° 238-USM-2019, fue determinado por la Dra. Mónica Arakaki Makishi.

Preparación de los extractos acuosos

2,5 kg de *Passiflora tripartita* var. *mollisima* e *Hylocereus megalanthus* fueron lavados con agua bidestilada e hipoclorito de sodio al 5%. Se les retiró la cáscara, seguido de un despulpado utilizando un colador de plástico para dejar la pulpa sin semillas quedándonos con 312 g de *P. tripartita* var. *mollisima* y 232 g de *H. megalanthus*. Las pulpas, así obtenidas, fueron liofilizadas en un equipo marca RIFICOR por 12 horas y almacenadas a -25°C, obteniendo pesos finales de 71,23 g de *P. tripartita* var. *mollisima* y 53,33 g de *H. megalanthus* con

rendimientos de 22,83 y 22,98%, respectivamente. Estas pulpas disueltas en agua bidestilada constituyen la muestra experimental para los siguientes análisis.

Determinación de polifenoles totales

La determinación de polifenoles totales se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Calixto *et al.*⁸ (2018). Las muestras liofilizadas fueron disueltas en agua bidestilada hasta obtener una solución stock (0,93 mg/mL y 32mg/mL para la *P. tripartita* var. *mollisima* e *H. megalanthus*, respectivamente). Se mezcló 100 µL de la solución stock con 150 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (diluido 1 en 3), luego de 5 minutos de reposo se añadió 150 µL de carbonato de sodio al 20% y 600 µL de agua bidestilada, la mezcla final se dejó reposar en oscuridad por 30 minutos y luego leída en espectrofotómetro a 760 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico como referencia a concentraciones de 1-7,5 µg/mL ($y=0.0916x + 0.008$, $R^2 = 0.9995$) y los resultados fueron expresados en equivalentes de ácido gálico (EAG) en mg/100g de muestra liofilizada.

Actividad inhibitoria de la enzima α -amilasa.

La inhibición de la enzima se llevó a cabo siguiendo la técnica usada por Wang *et al.*⁹ (2016) con ligeras modificaciones. Se preparó buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,9 con NaCl 0,1 M) y almidón de papa al 1% (disuelto en buffer) como sustrato. Las muestras fueron preparadas a distintas concentraciones, se mezcló 120 µL de la muestra con 30 µL de almidón, 100 µL de buffer, 90 µL de agua bidestilada y 60 µL de enzima α -amilasa (3 Unid/mL); después de 8 minutos de incubación a 37 °C se detuvo la reacción con 200 µL de ácido 3,5 dinitrosalicílico y 900 µL de agua bidestilada, la mezcla se volvió a incubar pero esta vez a 100 °C de temperatura durante 5 minutos y se enfrió con agua helada. La absorbancia fue determinada a 540 nm.

Para la preparación del blanco se reemplazó la enzima por el buffer. El control fue preparado reemplazando los extractos por agua bidestilada. Se utilizó como inhibidor estándar a la acarbosa. El porcentaje de inhibición de las muestras y acarbosa sobre la enzima α -amilasa fueron calculados con la siguiente fórmula.

$$\text{Inhibición (\%)} = ((A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{muestra}}) \times 100$$

El valor de IC_{50} se definió como la concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad enzimática. Este valor se obtuvo al graficar los valores de % de inhibición versus los valores de concentración de los extractos.

Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa

Se realizó con el método descrito por Wang *et al.*⁹ (2016). Las muestras se prepararon a distintas concentraciones. A 20 µL de la muestra se le adicionó 80 µL de buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,8), 120 µL de pNPG 1 mM como sustrato, 170 µL de agua bidestilada y 10 µL de enzima α -glucosidasa (3 Unid/mL); después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se detuvo la reacción con 600 µL de NaOH 1 M. La absorbancia fue determinada a 405 nm.

El blanco fue preparado cambiando la enzima por el buffer, mientras para el control se cambió los extractos por agua bidestilada. La acarbosa se utilizó como inhibidor estándar. El porcentaje de inhibición de las muestras y acarbosa sobre la enzima α -glucosidasa fueron calculados con la siguiente fórmula.

$$\text{Inhibición (\%)} = ((A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{muestra}}) \times 100$$

El valor de IC_{50} se definió como la concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad enzimática. Este valor se obtuvo al graficar los valores de % de inhibición versus los valores de concentración de los extractos.

Comportamiento de inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa

Para analizar el comportamiento inhibitorio que ejercen los extractos acuosos sobre las enzimas se utilizó el diagrama de Lineweaver–Burk. Se utilizó el mismo procedimiento antes descrito para la determinación de actividad de las enzimas, el sustrato de cada enzima fue preparado a distintas concentraciones y se mantuvo constante la concentración de las muestras. La acarbosa también fue utilizada para comparar el modo de inhibición de los frutos estudiados sobre las enzimas.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media y la desviación estándar de tres réplicas de ensayo. Para el test de normalidad se usó la prueba de Shapiro Wilk seguido de la prueba paramétrica de ANOVA de comparaciones múltiple con post Hoc de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de polifenoles totales

Los resultados muestran que el extracto acuoso de la *Passiflora tripartita* var. *mollissima* presentó una cantidad 38 veces mayor de polifenoles que la *Hylocereus megalanthus* (tabla 1), este valor obtenido en la *P. tripartita* var. *mollissima* fue semejante al encontrado por Contreras *et al.*¹⁰ (2011) donde el extracto metanólico de la pulpa reportó un valor de $635 \pm 2,71$ mg EAG/100g, cuyo valor fue cercano a nuestro estudio; en tanto Rojano *et al.*¹¹ (2012) reportaron una cantidad de polifenoles mayor en el extracto acuoso de la pulpa de *P. tripartita* var. *mollissima* $5012,8 \pm 68,2$ mg EAG/100g de muestra, esta diferencia de valores podría explicarse debido a la manera como se obtuvo el extracto con el uso de un homogeneizador y un agitador por un tiempo de 16 horas.

Otros frutos del género *Passiflora*, conocidos por su buena capacidad antioxidante, son la granadilla y la maracuyá. Carvajal *et al.*¹² (2011) trabajaron estos frutos, también bajo la forma de extractos acuosos, reportando valores totales de polifenoles de 204,54 mg EAG/100g para la granadilla y 282,16 mg EAG/100g para maracuyá. Siendo valores menores a los obtenidos en el presente estudio.

Tabla 1. Cantidad de polifenoles totales en los extractos acuosos de *P. tripartita* var. *mollisima* e *H. megalanthus*.

	<i>Cantidad de polifenoles totales*</i>
<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollisima</i>	614,67 ± 5,03
<i>Hylocereus megalanthus</i>	16,17 ± 0,32

* Resultados expresados mg EAG/ 100g de extracto ± DS

Los valores de polifenoles totales para la pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) obtenidas en el presente trabajo, son más bajas que el valor reportado por el tumbo serrano (*P. tripartita* var. *mollisima*) (tabla 1). Sin embargo no están tan lejos a los obtenidos por De Lima *et al.*¹³ (2013) quienes trabajaron con la pulpa de varias especies de pitahaya (*H. megalanthus*, *H. undatus*, *H. costaricensis* e *H. setaceus*). Para ello, realizaron una primera extracción con metanol y luego el residuo fue extraído con acetona, para finalmente juntar los sobrenadantes obtenidos. Sus resultados mostraron que la pitahaya púrpura (*H. costaricensis*) tuvo una mayor cantidad de polifenoles (24,71 mg EAG/100g de muestra) mientras que la pitahaya roja (*H. undatus*) y la pitahaya amarilla (*H. megalanthus*), obtenidas de un banco de germoplasma mostraron los niveles más bajos (11,45 y 11,94 mg EAG/100g de muestra, respectivamente).

Otro estudio de pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) mostró que el extracto etanólico de la pulpa poseía una cantidad de 150 mg EAG/100g de muestra¹⁴. El extracto etanólico de la pulpa de pitahaya roja, otra especie del género *Hylocereus*, tuvo un valor de 28,65 mg EAG/100g de muestra¹⁵.

Esta diferencia de valores podría explicarse por el tipo de solvente utilizado para la preparación del extracto, lo que supondría que los polifenoles presentes en los mencionados frutos no son únicamente polares.

Inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa

La inhibición de estas enzimas es uno de los principales objetivos de los fármacos utilizados en el tratamiento de la DM. El valor de IC₅₀ del tumbo serrano (*Passiflora tripartita* var. *mollisima*) como parámetro de inhibición para la α -glucosidasa mostró valores cercanos a los obtenidos al de la acarbosa que es un fármaco utilizado para el tratamiento de DM tipo II (tabla 2). Sin embargo, con la muestra de pitahaya amarilla el valor de IC₅₀ fue mayor. Por otro lado, el IC₅₀ del tumbo serrano (*P. tripartita* var. *mollisima*) mostró un valor muy alto de inhibición para la α -amilasa. No se observó efecto inhibitorio de la pitahaya amarilla sobre esta enzima. Rey *et al.*¹⁶ (2015) reportaron valores de IC₅₀ de la acarbosa muy elevados para las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa (773,2 y 229,6 μ g/mL, respectivamente). El IC₅₀ obtenido en nuestro estudio reportó valores muy elevados comparados con otras investigaciones debido a que el extracto acuoso obtenido consiguió mayormente la extracción de metabolitos polares, mientras que extractos obtenidos con solventes apolares y medianamente polares liberan otro tipo de metabolitos. La explicación a todos estos resultados del trabajo se debería también a la composición y tipos de polifenoles que tendría cada fruto en el extracto acuoso⁷.

Estudios reportan que el efecto hipoglicemiente de los frutos de la familia *Hylocereus* no es debido a la capacidad de inhibir a las enzimas digestivas, sino a su capacidad de mejorar la resistencia a la insulina e incrementar los niveles de expresión de genes de los receptores del factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21), el cual participa en la regulación del metabolismo de lípidos y glucosa, donde este FGF21 se encuentra elevado en pacientes diabéticos tipo II¹⁷.

Tabla 2. Valores de IC₅₀ de extractos acuosos y control.

	IC ₅₀ (µg/mL)		
	<i>P. tripartita</i> var. <i>mollisima</i>	<i>Hylocereus megalanthus</i>	Acarbosa
α-amilasa	1719,18 ± 134,38 ^a	ND	15,59 ± 0,86
α-glucosidasa	77,68 ± 8,27	8692,4 ± 128,2 ^b	68,04 ± 1,17

Resultados expresados en media ± desviación estándar

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

ND: no detectado

Otra investigación llevada a cabo con la pulpa del fruto de la *Passiflora subpeltata*, denominada “granada de zorra”, fue sometida a extracción con diferentes solventes (éter, cloroformo, acetona y metanol) mostrando actividad inhibitoria sobre las enzimas α-amilasa y α-glucosidasa cuyos menores valores de IC₅₀ fueron obtenidos con la acetona (21,85 y 46,35, respectivamente)¹⁸. Esto demuestra que el tipo de solvente influye en la extracción de los metabolitos inhibitorios presentes en la pulpa, lo que se refleja en los valores de IC₅₀. Das *et al.*¹⁹ (2012) trabajaron con el extracto acuoso de la pulpa de 22 especies diferentes de frutas, donde las especies *Phoenix sylvestris* y a la *Achras sapota* tuvieron las mejores actividades inhibitorias con valores de IC₅₀ de 5 y 53 µg/mL, respectivamente para la enzima α-amilasa y valores de IC₅₀ 9 y 56 µg/mL, respectivamente sobre la enzima α-glucosidasa. Un aspecto interesante de este trabajo es que los extractos de ambos frutos mostraron niveles bajos de polifenoles totales (6,9 y 1,5 mg EAG/100g de muestra, respectivamente), con lo que los autores concluyeron que los componentes no fenólicos presentes en los frutos podrían ser los responsables de la actividad inhibitoria enzimática.

La propiedad inhibitoria *in vitro* sobre las enzimas α-amilasa y α-glucosidasa también fue estudiada con extractos no acuosos (metanol, acetato de etilo y diclorometano) con diferentes partes de la especie *Annona muricata* (fruta, hoja, corteza de tallo y de raíz), donde se reportaron valores de IC₅₀ que variaron entre 1 a 27 µg/mL. Asimismo, esos extractos mostraron una inhibición de tipo acompetitiva sobre dichas enzimas. Por otra parte, en el mismo estudio, la acetogenina aislada de la pulpa resulto ser un mejor inhibidor de esas enzimas que la metformina (fármaco utilizado en el tratamiento de la diabetes tipo II), por lo que los autores concluyeron que la acetogenina sería el posible responsable de la actividad inhibitoria sobre las enzimas α-amilasa y α-glucosidasa²⁰.

Nuestro interés fue investigar el efecto inhibitorio que tienen las pulpas de los frutos tumbo serrano (*Passiflora tripartita* var. *mollisima*) y pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*)

en su condición acuosa, ya que son usualmente consumidas por la población peruana en forma fresca y/o en jugos y a las que se les atribuye una acción hipoglicemiante. El IC_{50} del extracto acuoso del tumbo serrano y de la acarbosa obtenidos, fueron cercanos, lo cual corroboraría que este fruto así consumido por la población tiene un efecto hipoglicemiante.

Comportamiento de inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa

Según el gráfico de Lineweaver-Burk el extracto acuoso de tumbo serrano mostró una inhibición de tipo no competitiva mixta y el extracto acuoso de pitahaya amarilla exhibió un comportamiento de tipo competitiva sobre la α -glucosidasa (figuras 1b y 1c). Con respecto a la α -amilasa solo se observó inhibición de tipo no competitiva mixta por parte del tumbo serrano (figura 1a).

Trabajos realizados con HPLC mostraron la presencia de flavonoides tipo orientin, vitexin, vicenin y schaftoside y otros en la pulpa del tumbo serrano²¹. Estos mismos flavonoides purificados de *Phyllostachyz edulis* han mostrado tener actividad inhibitoria sobre ambas enzimas de modo competitivo como es el caso del orientin y vitexin²². En nuestro caso el tipo de comportamiento inhibitorio no competitiva mixta se debería a la acción sinérgica de todos los metabolitos secundarios presentes en la *P. tripartita* var. *mollissima*.

El extracto acuoso de la *Hylocereus megalanthus* no presentó una buena actividad inhibitoria sobre las enzimas, logrando solo inhibir competitivamente a la enzima α -glucosidasa, lo que podría deberse a la presencia de ácido gallico en la pulpa, el cual ha manifestado en otros estudios la capacidad de inhibir a la enzima en mención²³.

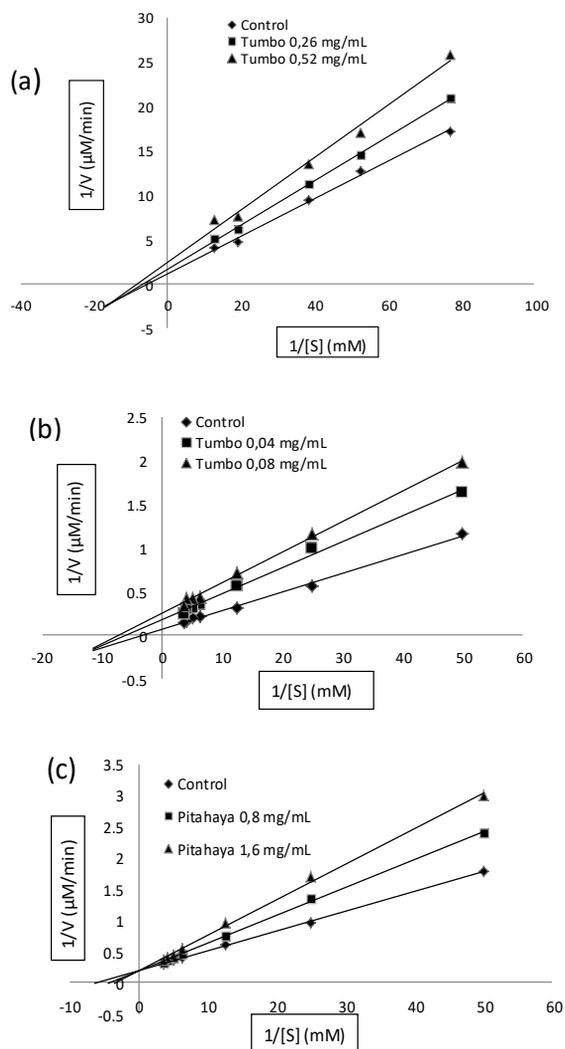


Figura 1. Análisis de diagramas de Lineweaver-Burk. (a) tumbo serrano (*P. tripartita* var. *mollisima*) frente α -amilasa. (b) tumbo serrano (*P. tripartita* var. *mollisima*) frente α -glucosidasa. (c) pitahaya amarilla (*H. megalanthus*) frente α -glucosidasa.

La acarbosa, por su parte, mostró en este estudio un tipo de inhibición competitiva frente a la α -glucosidasa y un tipo de inhibición no competitiva mixta frente a la α -amilasa, resultados que son coincidentes con lo reportado por Kim *et al.*²⁴.

Tabla 3. Parámetros cinéticos y modo de inhibición de los extractos acuosos sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa

	<i>α- glucosidasa</i>			<i>α- amilasa</i>		
	0	0,04	0,08	0	0,26	0,52
<i>P. tripartita</i> var. <i>mollisima</i> (mg/mL)						
Km	0,30	0,16	0,13	0,19	0,16	0,12
V _{máx.}	14,14	5,6	3,96	0,92	0,64	0,41
Tipo de inhibición	No competitiva mixta			No competitiva mixta		
<i>H. megalanthus</i> (mg/mL)	0	0,8	1,6			
Km	0,16	0,24	0,31	ND		
V _{máx.}	5,5	5,5	5,5			
Tipo de inhibición	Competitiva					

ND: no detectado

Los parámetros de Km y V_{máx} de los extractos acuosos de tumbo serrano y pitahaya se muestran en la tabla 3.

CONCLUSIONES

En el presente estudio el extracto acuoso del fruto tumbo serrano (*P. tripartita* var. *mollisima*) evidenció mayor capacidad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa y α - glucosidasa que la pitahaya amarilla (*H. megalanthus*). Nuestros resultados podrían contribuir al tratamiento complementario en pacientes con diabetes mellitus tipo II y también ser de interés en la industria alimentaria.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial a los docentes de la sección de Maestría en Bioquímica de la Facultad de Medicina por su apoyo en el laboratorio del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la UNMSM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bermúdez L, Cuéllar A, Abad M, Huamán J. Efecto hipoglucemiante de *Gentianella bicolor* (Wedd.) Fabris ex J.S. Pringle (Corpus Huay) en Sprague Dowley. Rev Cubana Plant Med. 2016; 21(1): 31-41.
2. Ministerio de Salud. Guía de Práctica Clínica para el Diagnóstico, Tratamiento y Control de la Diabetes Mellitus Tipo 2 en el Primer Nivel de Atención. Lima: Dirección de Prevención de Enfermedades No Transmisibles y Oncológicas; 2014.
3. Díaz M, Baiza L, Ibáñez M, Pascoe D, Guzmán A, Kumate J. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. Gac Med Mex. 2004; 140(4): 437-447.
4. Encina Zelada CR, Carpio Rivadeneira LJ. Máxima retención de ácido ascórbico, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en el néctar de tumbo. Ingeniería Industrial. 2011; 29: 225-245.
5. Loizzo MR, Lucci P, Núñez O, Tunids R, Balzano M, Frega NG, et al. Native Colombian Fruits and Their by-Products: Phenolic Profile, Antioxidant Activity and Hypoglycaemic Potential. Foods. 2019; 8(3): 89.
6. Kim H, Choi HK, Moon JY, Kim YS, Mosaddik A, Cho SK. Comparative antioxidant and antiproliferative activities of red and white pitayas and their correlation with flavonoid and polyphenol content. J Food Sci. 2011; 76(1): C38-45.
7. Wongsa P, Chaiwarit J, Zamaludien A. In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand. Food Chem. 2012; 131(3): 964-971.
8. Calixto M, Chire G, Orihuela C. Propiedades antioxidantes de chocolates comercializados en Perú. Acta Agron. 2018; 67(4): 479-485.
9. Wang W, Xu H, Chen H, Tai K, Liu F, Gao Y. In vitro antioxidant, anti-diabetic and antilipemic potentials of quercetagetin extracted from marigold (*Tagetes erecta* L.) inflorescence residues. J Food Sci Technol. 2016; 53(6): 2614-2624.
10. Contreras J, Calderón-Jaimes L, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. Food Res Int. 2011; 44(7): 2047-2053.
11. Rojano B, Zapata K, Cortés F. Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba). Rev Cubana Plant Med. 2012; 17(4): 408-419.
12. Carvajal de Pabon LM, Turbay S, Rojano B, Álvarez LM, Restrepo SL, Álvarez JM, et al. Algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante. Rev Cubana Plant Med. 2011; 16 (4): 354 – 363.
13. De Lima CA, Faleiro FG, Junqueira NTV, Cohen KO, Guimarães TG. Características físico-químicas, polifenóis e flavonoides amarelos em frutos de espécies de pitaias comerciais e nativas do cerrado. Rev Bras Frutic. 2013; 35(2):65-570.
14. Chauca M. Fenoles y capacidad antioxidante de guayaba (*Psidium guajava*), arándano (*Vaccinium myrtillus*) y fracciones comestibles y no comestibles de pitahaya (*Selenicereus*

- megalanthus*) y aguaymanto (*Physalis peruviana*). [Tesis de Pregrado]. Chachapoyas: Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; 2019.
15. Choo W, Yong W. Antioxidant properties of two species of *Hylocereus* fruits. *Adv Appl Sci Res.* 2011; 2 (3): 418-425.
 16. Rey D, Ospina L, Aragón M. Inhibitory effects of an extract of fruits of *Physalis peruviana* on some intestinal carbohydrases. *Rev Colomb Cienc Quím Farm.* 2015; 44(1): 72-89.
 17. Song H, Chu Q, Xu D, Xu Y, Zheng X. Purified Betacyanins from *Hylocereus undatus* Peel Ameliorate Obesity and Insulin Resistance in High-Fat-Diet-Fed Mice. *J Agric Food Chem.* 2016; 64(1): 236-244.
 18. Shanmugan S, Alcantara I, Denadai M, Dos Santos L, De Souza A, Narain N, et al. UHPLC-QqQ-MS/MS identification, quantification of polyphenols from *Passiflora subpeltata* fruit pulp and determination of nutritional, antioxidant, α -amylase and α -glucosidase key enzymes inhibition properties. *Food Res Int.* 2018; 108: 611-620.
 19. Das S, Das S, De B. In vitro inhibition of key enzymes related to diabetes by the aqueous extracts of some fruits of West Bengal, India. *Curr Nutr Food Sci.* 2012; 8(1): 19-24.
 20. Agu KC, Eluehike N, Ofeimun RO, Abile D, Ideho G, Ogedengbe MO, et al. Possible anti-diabetic potentials of *Annona muricata* (soursop): inhibition of α -amylase and α -glucosidase activities. *Clin Phytosci.* 2019; 5: 21.
 21. Simirgiotis MJ, Schmeda-Hirschmann G, Bórquez J, Kennelly EJ. The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) fruit: a source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. *Molecules.* 2013;18(2):1672-1692.
 22. Yang JP, He H, Lu YH. Four flavonoid compounds from *Phyllostachys edulis* leaf extract retard the digestion of starch and its working mechanisms. *J Agric Food Chem.* 2014; 62(31): 7760-7770.
 23. Guevara M, Tejera E, Granda-Albuja MG, Iturralde G, Chisaguano-Tonato M, Granda-Albuja S, et al. Chemical Composition and antioxidant activity of the main fruits consumed in the western coastal region of Ecuador as source of health promoting compounds. *Antioxidants (Basel).* 2019; 8(9): 387.
 24. Kim MJ, Lee SB, Lee HS, Lee SY, BAek JS, Kim D, et al. Comparative study of the inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and cyclomalto-dextrin glucanotransferase by acarbose, isoacarbose, and acarviosine-glucose. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 371(2): 277-283.

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LOS TUBÉRCULOS DE *Ullucus tuberosus* CALDAS

Ingrit Elida Collantes Díaz^{a1}, Elena Alicia Córdor Cuyubamba²

RESUMEN

Este trabajo describe el análisis fitoquímico del zumo liofilizado de los tubérculos de *Ullucus tuberosus*, nativos de la región andina, los cuales son usados en la gastronomía peruana. A partir de la extracción con solventes orgánicos y separación por transesterificación de los ácidos grasos y métodos cromatográficos, fueron identificados por primera vez la presencia del éster metílico del ácido palmítico y los esteroides estigmasterol y espinasterol en la especie en estudio, estos compuestos fueron identificados por análisis de sus espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno-1 y de carbono-13.

Palabras clave: *Ullucus tuberosus*, tubérculos, estigmasterol, espinasterol.

CONTRIBUTION TO THE PHYTOCHEMICAL STUDY OF TUBERS FROM *Ullucus tuberosus* CALDAS

ABSTRACT

This paper describes the phytochemical analysis of the lyophilized juice of the tubers from *Ullucus tuberosus*, native of the Andean region, which are used in Peruvian gastronomy. From organic solvents extraction and separation by transesterification of fatty acids and chromatography methods, the presence of palmitic acid methyl ester and stigmasterol and spinasterol steroids in the species under study were first identified, these compounds were identified by analysis of its nuclear magnetic resonance spectra hydrogen-1 and carbon-13.

Key words: *Ullucus tuberosus*, tuber, stigmasterol, spinasterol

^a Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru N° 210, Lima, Perú, ingrit_uni@hotmail.com

^b Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería.

INTRODUCCIÓN

El Perú es un país que presenta una amplia flora, es muy rico en leguminosas (todas las menestras de consumo humano y otras), gramíneas (la amplia variedad de maíz) y de tubérculos, entre los cuales tenemos la gran variedad de papa, oca, ollucos, etc. Todos ellos consumidos por los seres humanos y son esenciales en su dieta diaria¹.

El *Ullucus tuberosus* Caldas es una planta herbácea que pertenece al género *Ullucus* de la familia de las *Basellaceae*; es nativa de la región de los Andes (2800 – 4000 msnm) y ocurre desde Venezuela hasta Chile y Argentina. *U. tuberosus* es la única especie en el género *Ullucus* y son aceptados dos subespecies *tuberosus*, todas aquellas especies cultivables, y la subespecie *aborigineus*, que engloba a las especies silvestres^{2,3}. Algunos autores afirman que es una planta domesticada hace 5500 años en la región de los Andes⁴ mientras que otros autores afirman que las poblaciones andinas la consumían por los 9000 – 8500 años AC³. Es conocida bajo los nombres de papa lisa o chugua (Colombia), melloco, rubas (Ecuador), olluco, olloco, ullush, ulluco, ulluma, papa lisa, lisas e ilaco (Perú y Bolivia). *U. tuberosus*, dependiendo del país, además de ser una fuente alimenticia en la región de los Andes, también es usada en medicina tradicional para el tratamiento de diabetes, así como antiinflamatorio, analgésico y cicatrizante². En el Perú la especie es usada en la alimentación y existen en diferentes colores que van desde el blanco, amarillo, anaranjado, rojo, morado y una variedad con manchas de diversos colores⁵.

Estudios de los metabolitos secundarios presentes en *U. tuberosus* han reportado la presencia de betalainas^{6,5,7} y de las saponinas triterpénicas tuberosidas A, B, y C². El extracto bruto cetónico de la pulpa de los tubérculos presenta una excelente actividad cicatrizante⁴.

El presente trabajo reporta la presencia de los ésteres metílicos y los esteroides mayoritarios presentes en la fracción apolar del zumo liofilizado de *U. tuberosus*. La identificación de estos compuestos se realizó por análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas (CG-EM) y por análisis de sus espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono 13 (RMN de ¹H y RMN de ¹³C).

PARTE EXPERIMENTAL

Muestra

Los tubérculos de color anaranjado fueron comprados de un productor de la región del Callejón de Huaylas, en los alrededores de Huaraz. En la tabla 1 presentamos la clasificación taxonómica de *U. tuberosus* y en la figura 1 presentamos la foto de la especie en estudio.

Tabla 1. Taxonomía de *Ullucus tuberosus* Caldas

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Basellaceae
Género	<i>Ullucus</i>
Especie	<i>Ullucus tuberosus</i> Caldas

**Figura 1.** Foto de los tubérculos de *Ullucus tuberosus* Caldas.

Extracción e identificación de los metabolitos secundarios

Los tubérculos fresco de *U. tuberosus* fueron higienizados, secados y pesados (4 kg). A través de un extractor fue obtenido el zumo y el bagazo, los que fueron congelados y liofilizados.

El zumo liofilizado (285,14 g) fue macerado con metanol (MeOH) tres veces. El metanol del extracto orgánico se evaporó en campana, obteniéndose el extracto bruto orgánico (EBO) (59,99 g); el EBO fue sometido a partición líquido-líquido, a partir del cual se obtuvieron los residuos, clorofórmico (RCHCl₃) 1,2 g, butanólico (RBUOH) 12,9 g y acuoso (RH₂O) 45,89 g. Del RCHCl₃ se tomó 278,7 mg para ser sometido a fraccionamiento en cromatografía en columna usando como fase estacionaria sílica-gel fase normal y como fase móvil se usó éter de petróleo (EP), cloroformo (CHCl₃) y MeOH, obteniéndose así, la fracción de éter de petróleo (FEP), la fracción clorofórmica (FCHCl₃) y la fracción metanólica (FMeOH).

Para la identificación de los ácidos grasos presentes en los tubérculos fue necesario hacer una transesterificación de la FEP. La transesterificación fue siguiendo las normas del Instituto Adolf Lutz⁸. A aproximadamente 25 mg de FEP se adicionó 3 mL de n-hexano y 15 mL de la solución de ácido sulfúrico al 2 % en metanol. La mezcla fue sometida a reflujo por una hora, luego fue enfriada y adicionada sobre solución saturada de cloruro de sodio hasta que la fase hexánica llegue hasta el nivel pre-establecido en una fiola. Los ésteres metílicos formados se encuentran en la fase hexánica, que fue concentrada y analizada por CG-EM⁹.

La masa restante del RCHCl_3 (918,8 mg) fue sometida a fraccionamiento usando como fase estacionaria sephadex LH-20 y como fase móvil fue EP, diclorometano (DCM) y MeOH, obteniéndose las fracciones de fracción de éter de petróleo (FEP-1 con masa de 319,49 mg), fracción de diclorometano (FDCM con masa de 86,7 mg) y fracción de metanol (FMeOH-1 con masa de 512,61 mg).

La FEP-1 fue sometida a fraccionamiento, usando como fase estacionaria sílica-gel fase normal y como fase móvil la mezcla de los solventes EP, acetato de etilo (AcOEt), CHCl_3 y MeOH de polaridad creciente, se obtuvieron 64 fracciones, que fueron sometidas a cromatografía en capa delgada analítica en cromatofolios de sílica-gel y revelando con una solución de ácido sulfúrico al 20 %, seguida de calentamiento. Luego fueron reunidas siguiendo un patrón de semejanza, obteniéndose las fracciones 27 – 29 y 35 – 36, ambas fracciones fueron sometidas a análisis por resonancia magnética nuclear para su identificación.

Análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas

Para los ésteres metílicos.- El análisis por cromatografía gaseosa fue realizado en un cromatógrafo a gas acoplado a un espectrómetro de masas (Shimadzu, modelo CGMS-QP2010 Ultra) con las siguientes condiciones de análisis: columna capilar Restek Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); temperatura del inyector 240 °C, temperatura del detector 230 °C; impacto de electrones a 70 eV, con gas de arrastre helio a un flujo de 1,23 mL/min, con split 1/5; con un programa de temperatura de 120°C (2') – 280°C, 2°C/minuto; y con volumen de inyección de 3 μL .

La identificación de las sustancias componentes fue a través de la comparación de los espectros de masas con el banco de datos del sistema de CG-EM de NIST 62 lib. y con la inyección de los siguientes patrones: hidrocarburos (Mixture for GC, 98 %, Lot: 65H5950, Sigma-Aldrich).

Análisis por resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y de ^{13}C fueron registrados en un espectrómetro Bruker de 500 MHz, operando a 500 MHz para los espectros de hidrógeno y para la obtención de los espectros de carbono ^{13}C operaba a 125 MHz. Los espectros fueron obtenidos en cloroformo deuterado (CDCl_3) de la marca MERCK.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El zumo obtenido del material fresco fue liofilizado, demostrando que el 90,2 % es agua y el material obtenido después de la liofilización fue un sólido amarillo (285,14 g), que al ser macerado con MeOH se obtuvo un extracto de color amarillo intenso, la maceración se realizó tres veces consecutivas. La tercera maceración fue levemente amarilla. El EBO obtenido fue de 59,99 g (1,49 %) de color amarillo intenso y de olor característico del *U. tuberosus dulce*.

La FEP del RCHCl_3 , después de ser sometida a transesterificación para obtener los ésteres metílicos presentes en el zumo de *U. tuberosus*, fue analizada por CG-EM, obteniéndose un pico intenso (con tiempo de retención 31,656 min) en el cromatograma de iones totales (figura 2) que representa el 83,91 % de la FEP y fue identificado como el éster metílico del ácido palmítico por análisis de su espectro de masas.

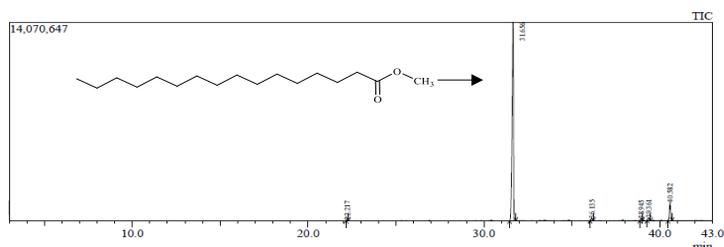


Figura 2. Cromatograma de iones totales obtenido por CG-EM de los ésteres metílicos del zumo de los tubérculos de *U. tuberosus*.

Con el análisis de los espectros de RMN^{-1}H y de RMN^{-13}C de las fracciones 27 – 29 y 35 – 36 fueron identificados los esteroides estigmasterol (**1**) para la primera fracción y espinasterol (**2**) para la segunda fracción.

El espinasterol ya fue aislado de otras plantas como espinacas, *Samanea saman* y este esteroide presenta actividad antiproliferativa de las células CACO-2, con una concentración mínima inhibitoria de 60 nM/mL, también tiene un significativo potencial terapéutico para modular el desarrollo y/o progreso de la nefropatía diabética, antiinflamatorio, antitumoral, antioxidante, antiulcerogénico¹⁰.

Compuesto 1.- Se obtuvo 9,3 mg de unos cristales transparentes. Por análisis de sus desplazamientos químicos de sus espectros de RMN se llegó a la conclusión de que la muestra es el esteroide estigmasterol (figura 3). RMN^{-1}H : δ 0,68 (3H, s, H-18), 0,80 (3H, d, $J = 6,75$ Hz, H-27), 0,81 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, H-29), 0,85 (3H, d, $J = 6,7$ Hz H-26), 1,00 (3H, s, H-19), 1,01 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H-21), 3,59 (1H, m, H-3), 5,01 (1H, dd, $J = 14,95, 8,5$ Hz, H-22), 5,15 (1H, dd, $J = 15,25, 8,85$ Hz, H-23), 5,35 (1H, m, H-6). RMN^{-13}C : δ 21,21 (C-18), 12,31 (C-29), 18,97 (C-27), 19,38 (C-19), 21,06 (C-11, C-26), 21,25 (C-21, C-27), 24,28 (C-15), 25,38 (C-28), 28,91 (C-16), 31,52 (C-2), 31,87 (C-7), 32,07 (C-8, C-25), 36,51 (C-10), 37,01 (C-1), 39,95 (C-12), 40,49 (C-20), 42,29 (C-13), 42,49 (C-4), 49,52 (C-9), 51,23 (C-24), 56,1 (C-17), 56,61 (C-14), 71,39 (C-3), 121, 72 (C-6), 129,22 (C-23), 138,35 (C-22) y 140,75 (C-5)¹¹.

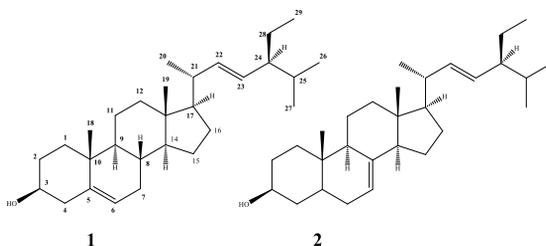


Figura 3. Esteroides identificados en el zumo de los tubérculos de *U. tuberosus*.

Compuesto 2.- Se obtuvo 6,2 mg de un sólido blanco, por análisis de sus espectros de RMN se llegó a la conclusión que la muestra fue identificada como espinasterol (figura 3). RMN-¹H: δ 0,56 (3H, s, Me-18), 0,80 (3H, s, Me-19), 0,81 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-27), 0,82 (3H, t, $J = 7,3$ Hz, H-29), 0,86 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, Me-26), 1,04 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, Me-21), 3,60 (1H, m, H-3), 5,03 (1H, dd, $J = 15,25; 8,55$, H-23), 5,16 (1H, dd, $J = 15,25; 8,85$, H-22), 5,17 (1H, m, H-7). RMN-¹³C: δ 12,04 (C-18), 12,23 (C-29), 13,03 (C-19), 18,98 (C-27), 21,07 (C-26), 21,36 (C-21), 21,55 (C-11), 23,01 (C-15), 25,39 (C-28), 28,48 (C-16), 29,65 (C-6), 31,48 (C-2), 31,87 (C-25), 34,23 (C-10), 37,15 (C-1), 38,01 (C-4), 39,47 (C-12), 40,26 (C-5), 40,79 (C-20), 43,28 (C-13), 49,46 (C-9), 51,25 (C-24), 55,13 (C-14), 55,85 (C-17), 71,06 (C-3), 117,46 (C-7), 129,46 (C-23), 138,15 (C-22) y 139,57 (C-8) los desplazamientos químicos están conforme la referencia¹¹.

CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico del zumo de los tubérculos de *U. tuberosus* de las fracciones apolares permitió la identificación del ácido graso palmítico como el mayoritario. También fueron identificados los esteroides estigmasterol y espinasterol. Es la primera vez que se reporta la presencia de estas moléculas en los tubérculos de la especie en estudio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería, por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo de investigación (Proyecto de Investigación Formativa 2018 código: FIQT-F-1-2018).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Suquilanda M. Producción orgánica de cultivos andinos. Quito, Ecuador: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; 2012.
2. Espada A, Jiménez C, Dopeso J, Riguera R. Tuberosides A, B, and C, Novel triterpenoid saponins from the hypoglycaemic fraction of *Ullucus tuberosus*. Liebigs Annalen. 1996; 5: 781-784. <https://doi.org/10.1002/jlac.199619960523>
3. Manrique I, Arbuza C, Vivanco F, Gonzales R, Chávez O, Tay D, et al. Colección de germoplasma de Ullucu conservada en el Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP); 2017.
4. Heil N, Bravo K, Montoya A, Robledo S, Osorio E. Wound healing activity of *Ullucus tuberosus*, an Andean tuber crop. Asian Pac J Trop Biomed. 2017; 7(6): 538-543.
5. Sveson J, Smallfield BM, Joyce NI, Sansom CE, Perry NI. Betalains in red and yellow varieties of the Andean tuber crop Ulluco (*Ullucus tuberosus*). J Agr Food Chem. 2008; 56: 7730-7737. <https://doi.org/10.1021/jf8012053>
6. Cejudo-Bastante MJ, Hurtado N, Mosquera N, Heredia FJ. Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (*Ullucus tuberosus*) extracts under different pH and thermal conditions. Food Res Int. 2014; 64: 465-471.
7. Campos D, Noratto G, Chirinos R, Arbizu C, Roca W, Cisneros-Zevallos L. Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum* sp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), Oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). J Sci Food Agric. 2006; 86: 1481-1488.
8. Instituto Adolf Lutz. Normas analíticas. 3 Edição. São Paulo: IMESP; 1985. p 245-266
9. Díaz IEC, Gonçalves EG, Marques MOM, Yoshida M. Constituyentes químicos del tubero de *Dracontium spruceanum* (Schott) G. Zhu ex *Dracontium lorentense* Krause (Araceae). Rev Soc Quím Perú. 2011; 77(4): 275-284.
10. Ragasa CY, Galian RF, Arenal M, Tan V, Shen Ch-Ch. Chemical constituents of *Petersianthus quadrialatus* (Merr.). Res J Pharm Biol Chem Sci. 2014; 5(4): 1501 – 1507.
11. Kojima H, Sato N, Hatano A, Ogura H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris* Phytochem. 1990; 29(7): 2351-2355.

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL ZUMO DE *Colignonia parviflora* SUBSP. BIUMBELLATA (SAQTA)

Juan Carlos Chipayo Auccapuma, Jessica Ivana Nieto Juárez,
Ingrit Elida Collantes Díaz*

RESUMEN

En el presente trabajo se investigó las raíces de *Colignonia parviflora* subsp. biumbellata, fue adquirida en la ciudad de Chinchero, a 3780 msnm. Fueron identificados 24 componentes químicos entre ésteres metílicos, monoterpeno, sesquiterpenos, fenilpropanos y alcoholes alifáticos en el aceite esencial de la raíz. La identificación fue a través de la comparación de los espectros de masas con el banco de datos del sistema de CG-EM (NIST 14) y por el análisis de sus espectros de masas obtenidos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas. En la fase apolar del zumo de la raíz fueron identificados sus ácidos grasos mayoritarios y los metabolitos secundarios β -sitosterol, estigmasterol, estigmasta-7-en-3-ol, estigmasta-7,22-dien-3-ol, el éster metílico del ácido ferúlico y el ácido oleánico.

Palabras clave: *Colignonia parviflora* subsp. biumbellata, saqta, aceite esencial, esteroides.

CONTRIBUTION TO THE PHYTOCHEMICAL STUDY OF ZUMO FROM *Colignonia parviflora* SUBSP. BIUMBELLATA (SAQTA)

ABSTRACT

In the present work, the roots of *Colignonia parviflora* subsp. biumbellata, was acquired in the city of Chinchero at 3780 msnm. Twenty four chemical compounds were identified among methyl esters, monoterpenes, sesquiterpenes, phenylpropanoid and aliphatic alcohols in the root essential oil, the identification was through the comparasion of the mass spectra with the data bank of the CG-MS system (NIST 14) and by the analysis of their mass spectra obtained by gas chromatography coupled to a mass spectrometer. In the apolar phase of the root juice, its major fatty acids and secondary metabolites β -sitosterol, stigmasterol, stigmast-7-en-3 β -ol, stigmast-7,22-dien-3 β -ol, methyl ester of ferulic acid and oleanic acid.

Key words: *Colignonia parviflora* subsp. biumbellata, saqta, essential oil, steroids.

INTRODUCCIÓN

La familia Nictaginaceae comprende cerca de 30 géneros y 400 especies, con distribución pantropical, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del nuevo mundo. La familia incluye arbustos, árboles y raramente lianas o hierbas. A través de los estudios moleculares se han determinado siete tribus que conforman la familia: Boldoeae, Bougainvilleae, Caribeeae, Colignonieae, Leucastereae, Nyctagineae y Pisonieae¹. En el Perú se distribuyen 11 géneros con 53 especies, la mayoría son arbustos o hierbas². Dentro del género *Colignonia* están las especies *C. glomerata* Griseb, *C. ovalifolia* Heimerl, *C. parviflora*, *C. pentoptera* J.E. Bohlin, *C. rufopilosa* Kuntze, *C. scandens* Benth. La especie objetivo de nuestro estudio, *Colignonia parviflora* subsp. *biumbellata* es un arbusto que crece en la región andina del Perú, puede ser encontrada en el Cusco (Chinchero), Lima (Yauyos)³, La libertad⁴, Moquegua (Cuenca río Ilo-Moquegua)⁵, la especie es popularmente conocida con los nombres de “saqta”, “sacha paraqai” y tradicionalmente los pobladores de la región de Chincheros de la provincia de Anta del departamento del Cusco, utilizan las ralladuras de la raíz en agua ya que forma bastante espuma que actúa como detergente y son usadas para el lavado de la lana de ovejas o alpaca para ser teñidas posteriormente, hecho que fue presenciado por los autores.

La especie en estudio no presenta estudios fitoquímicos, pero sí hay estudio de una especie próxima la *C. scandens*, se usa el decocto de la raíz para lavar la ropa y como depurativo de la piel en casos de sarampión, la planta es conocida con los nombres de sacha paracay, llupplunsha, jaboncillo y quinuanya. De *C. scandens* fueron aislados e identificados las siguientes saponinas chikusetsusaponin IV y chikusetsusaponin V⁶.

El presente trabajo reporta la identificación de 25 componentes químicos en el aceite esencial de la raíz de *C. parviflora* subsp. *biumbellata*, fueron identificados a través de la comparación de los espectros de masas con el banco de datos del sistema de CG-EM de NIST 14 y por análisis de sus espectros de masas obtenidos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas. En la fase apolar del zumo de la raíz fueron identificados los ácidos grasos mayoritarios (linoleico, palmítico y 6-octadecenoico), así como también, fueron aislados e identificados los esteroides sitosterol (1), estigmasterol (2), estigmasta-7-en-3-ol (3) y estigmasta-7,22-dien-3-ol (4) también llamado de espinasterol, el fenil propanoide éster metílico del ácido ferúlico (5) y el ácido oleánico (6).

PARTE EXPERIMENTAL

Colecta de la muestra e identificación botánica

Fueron compradas las raíces (figura 1) en un mercado artesanal en Chinchero-Cusco (febrero de 2019) a 3780 msnm. La identificación botánica (tabla 1) fue realizada por el profesor Dr. Washington Galiano Sánchez de la Universidad Nacional de San Antonio de Abad del Cusco.



Figura 1. Raíces de saqta adquiridas en el mes de febrero de 2019.

Tabla 1. Identificación taxonómica de *C. parviflora* subsp. *biumbellata* (Ball) JEBohlin.

Clase:	Equisetopsida C. Agard
Subclase:	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden:	Caryophyllanae Takht.
Orden:	Caryophyllales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Familia:	Nyctaginaceae Juss.
Género:	<i>Colignonia</i> Endl.
Especie:	<i>Colignonia parviflora</i> subsp. <i>biumbellata</i> (Ball) JEBohlin

Extracción y aislamiento de los fitoconstituyentes

Fueron adquiridos 2,547 kg de raíz fresca, la cual fue separada en dos partes, una parte (850 g) para la obtención del aceite esencial y la diferencia (1,697 kg) fue sometida a extracción del zumo (970 mL) (figura 2) en un extractor de jugos eléctrico doméstico de la marca OSTER, obteniéndose 727 g de bagazo de la raíz.



Figura 2. Zumo obtenido de la raíz saqta fresca.

Obtención del aceite esencial.- Las raíces (850g) fueron sometidas a extracción del aceite esencial por hidrodestilación con aparato de Clevenger⁷, el aceite esencial fue extraído con éter de petróleo y secado con sulfato de sodio anhidro para posteriormente ser analizado por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas (CG-EM)⁸.

Partición líquida-líquida del zumo.- El zumo fue sometido a partición líquido-líquido⁹ para la obtención de los residuos clorofórmico (RCHCl₃) 2,1535 g, residuo butanólico (R₂BuOH) 3,172 g y residuo acuoso (RH₂O) 12,34 g, las fases acuosas de los residuos fueron liofilizadas. El RCHCl₃ fue sometido a fraccionamiento por cromatografía en columna abierta, usando como fase estacionaria sephadex LH-20 y los eluyentes fueron éter de petróleo (EP), diclorometano (DCM) y metanol (MeOH), así se obtuvo la fracción de éter de petróleo (FEP) 1,125 g, fracción de diclorometano (FDCM) 155,5 mg y la fracción metanólica (FMeOH) 0,873 g.

Transesterificación de los ácidos grasos.- Ochenta miligramos de la FEP fue transesterificado para determinar el ácido graso mayoritario, siguiendo el método de obtención y análisis por Díaz *et al.*, 2011¹⁰.

Fraccionamiento de la fracción de éter de petróleo y de diclorometano.- Las fracciones de éter de petróleo (FEP) y de diclorometano (FDCM) fueron sometidas a fraccionamiento por cromatografía en columna abierta por separado, usado como fase estacionaria sílica-gel (fase normal) y como eluyente la mezcla de los solventes (éter de petróleo, acetato de etilo, cloroformo y metanol) de polaridad creciente. Del fraccionamiento fueron obtenidos 68 y 34 subfracciones de la FEP y FDCM, respectivamente, las subfracciones fueron analizadas por separado por cromatografía de capa delgada analítica (usando como revelador H₂SO₄ al 25%, seguida de calentamiento) y reunidas siguiendo un patrón de similaridad. Después de ser analizados por separado se realizó la comparación final de las subfracciones de ambas columnas (FEP y FDCM) con la finalidad de obtener fracciones de mayores cantidades para realizar el aislamiento a través de cromatografía de capa delgada preparativa (placa de vidrio de 20 x 20 cm) usando como fase estacionaria sílica gel, las placas preparadas en el laboratorio tenían 1mm de espesor. Para aislar las moléculas III, IV y VI se hizo un corte lateral (~ 1,5 cm) en la placas preparativas y se reveló con H₂SO₄ al 25 % ya que estas moléculas no revelan bajo la luz a 254 o 356 nm de una lámpara ultravioleta.

Los compuestos **I** y **II** son una mezcla y fueron obtenidos como cristales de la reunión de las fracciones 29-30 (FEP) con la fracción 16 (FDCM), estos cristales fueron sometidos a análisis por RMN para su identificación.

De la reunión de las muestras 38-40 (FEP) y 19-20 (FDCM) se obtuvo 18,3 mg de masa, esta muestra fue sometida a cromatografía de capa delgada preparativa (CCDP) con la mezcla de EP:AcOEt en la proporción 4:1 eluido por tres veces consecutivas, de la cual se obtuvo tres subfracciones, la subfracción 2 es la mezcla de los compuestos **III** y **IV**.

La muestra 23-27 (FDCM) fue sometida a purificación a través de CCDP usando como eluente la mezcla de solventes EP:AcOEt 4:1, fue eluido por tres veces consecutivas, obteniéndose así el compuesto **V**.

El compuesto **VI** fue obtenido de la purificación por cromatografía de capa delgada preparativa de la fracción 41- 44 (FEP) (25,7 mg) usando como eluente la mezcla de EP:AcOEt en la proporción 4:1 eluido por tres veces consecutivas.

Análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas

Análisis de los ésteres metílicos.- El análisis por cromatografía gaseosa fue realizado en un cromatógrafo a gas acoplado a un espectrómetro de masas (Shimadzu, modelo CGMS-QP2010 Ultra) con las siguientes condiciones de análisis: columna capilar Restek Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m); temperatura del inyector 240 °C, temperatura del detector 230 °C; impacto de electrones a 70 eV, con gas de arrastre helio a un flujo de 1,23 mL/min, con split 1/5; con un programa de temperatura de 120°C (2') – 280°C, 2°C/minuto; y con volumen de inyección de 3 μ L.

La identificación de las sustancias componentes fue a través de la comparación de los espectros de masas con el banco de datos del sistema de CG-EM de NIST 14 lib. y con la inyección de los siguientes patrones: ésteres metílicos (Mixture for GC, 37 component fame, Lot: LRAC1814, Sigma-Aldrich).

Análisis de los aceites esenciales.- El análisis por cromatografía gaseosa fue realizado en un cromatógrafo a gas acoplado a un espectrómetro de masas (Shimadzu, modelo CGMS-QP2010 Ultra) con las siguientes condiciones de análisis: columna capilar Restek Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m); temperatura del inyector 260 °C, temperatura del detector 260 °C; impacto de electrones a 70 eV, con gas de arrastre helio a un flujo de 1,48 mL/min, con split 1/5; con un programa de temperatura de 80°C (5') – 280°C (5'), 8°C/minuto; y con volumen de inyección de 3 μ L.

La identificación de las sustancias componentes fue a través de la comparación de los espectros de masas con el banco de datos del sistema de CG-EM de NIST 14 lib y por análisis de sus espectros de masas obtenidos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas. Así como, con la inyección de los siguientes patrones: hidrocarburos (Mixture for GC, C8-C40 alkanes calibration, Lot LRAC1880 Sigma-Aldrich).

Análisis por resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y de ^{13}C fueron registrados en un espectrómetro Bruker de 500 MHz, operando a 500 MHz para los espectros de hidrógeno y para la obtención de los espectros de carbono 13 operaba a 125 MHz. Los espectros fueron obtenidos en cloroformo y metanol deuterados (CDCl_3 y CD_3OD) de la marca MERCK.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la extracción por hidrodestilación se obtuvo 42 mg de aceite esencial de la raíz de la saqta, representando ese valor el 0,0049% de rendimiento. El aceite inicialmente era transparente, con el pasar del tiempo se tornó de color amarillo claro. El análisis del aceite esencial por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas condujo a la identificación de 24 moléculas (tabla 2). Los compuestos mayoritarios son el *p*-vinil-guayacol (9,8 %) y los ésteres metílicos de los ácidos grasos linoleico (28,6 %), linolénico (12,2 %), palmítico (5,9 %). También fueron identificados otros componentes como monoterpenos, fenilpropanos, sesquiterpenos, alcoholes alifáticos, éster metílico y éster butílico de ácido graso de bajos porcentajes.

Tabla 2. Composición química del aceite esencial de la raíz saqta, con su tiempo de retención y su porcentaje de presencia de cada componente.

N°	T. R.	%	Nombre	N°	T. R.	%	Nombre
1	8 857	0,53	Nonanol	13	15 862	1,04	<i>cis</i> -Sesquisabineno hidrato
2	9 342	0,25	α -Terpineol	14	16 419	1,93	<i>trans</i> -Sesquisabineno hidrato
3	10 147	0,26	Geraniol	15	17 282	0,45	α -Acorenol
4	11 894	9,77	<i>p</i> -vinil-Guayacol	16	17 774	2,42	β -Bisabolol
5	13 227	0,68	β -Damascenona	17	18 440	0,15	Éster metílico del ácido mirístico
6	13 542	0,20	Metil eugenol	18	18 851	0,12	Xantorrizol
7	13 784	1,24	β -Ionol	19	19 602	1,47	Salicilato de 2-etilhexil
8	13 886	0,18	Cariofileno	20	20 495	0,33	Hexadecanol
9	14 236	0,94	Sesquisabineno	21	21 060	5,85	Éster metílico de ácido palmítico
10	14 830	0,07	γ -Curcumeno	22	23 092	28,64	Éster metílico de ácido linoleico
11	15 557	1,01	β -Sesquifelandreno	23	23 170	12,22	Éster metílico del ácido linolénico
12	15 761	0,23	Italiceno éter	24	26 011	1,68	Éster butílico del ácido linolénico

T.R.: Tiempo de retención.

Los ácidos grasos libres y los triglicéridos presentes en las fracciones apolares de los extractos vegetales no son volátiles, es por esa razón que no se pueden analizar por cromatografía gaseosa. Para identificar los ácidos grasos se realiza la transesterificación. El análisis de los ésteres metílicos presentes en la FEP del RCHCl_3 del zumo de la raíz saqta fresca fue realizado por cromatografía gaseosa acoplado a espectrómetro de masas. En la tabla 3 se reporta la identificación de los tres ésteres metílicos mayoritarios que representan el 84,47 %, en la que se observa el ácido linoleico como mayoritario con 45,5 %, siendo este ácido considerado como un ácido graso esencial¹¹.

Tabla 3. Porcentaje de la presencia de los ésteres metílicos mayoritarios en la fracción de éter de petróleo.

N°	T.R.	%	Nombre
1	29 785	20,83	Éster metílico del ácido palmítico
2	37 329	45,49	Éster metílico del ácido linoleico
3	37 551	18,15	Éster metílico del ácido 6-octadecenoico

T.R. : Tiempo de retención.

El fraccionamiento de las fracciones de éter de petróleo y de diclorometano del residuo clorofórmico del zumo de la raíz fresca de saqta condujo al aislamiento y/o identificación de 6 metabolitos secundarios (figura 3) a través del análisis de sus espectros de RMN de ^1H y RMN de ^{13}C . Los compuestos **1-2**, y **3-4** fueron obtenidos en mezcla, ambas mezclas son dos pares de esteroides muy comunes como constituyentes químicos en las plantas, pueden estar en diferentes proporciones y son inseparables, por ejemplo tenemos la mezcla de **1** y **2**, fueron obtenidos de *Cochlospermum vitifolium* y en la proporción de 3:1¹².

Compuestos 1 y 2.- Fue obtenido 37 mg de unos cristales transparentes. A través del análisis de sus espectros de RMN- ^{13}C (tabla 4) y RMN- ^1H fue determinado que el compuesto **1** es el esteroide β -sitosterol y el compuesto **2** es el estigmasterol. Por la integración de sus señales del espectro de RMN- ^1H podemos afirmar que los compuestos **1** y **2** se encuentran en la relación de 1:3. Los desplazamientos químicos del compuesto **1** (CDCl_3 , 500MHz) δ ppm: 0,69 (3H, s, H-18), 0,81 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H-26), 0,83 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H-27), 0,88 (3H, t, $J = 6$ Hz, H-29), 0,93 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, H-21), 1,02 (3H, s, H-19), 1,24 (5H, m, H-11, 22, 23, 1, 8), 1,31 (5H, m, H-1, 15, 16, 12, 2), 1,42 (2H, m, H-9, 14), 1,51 (6H, m, H-2, 12, 11, 28, 24, 17), 1,68 (4H, m, H-7, 20, 15, 16), 1,84 (1H, m, H-25), 2,01 (1H, m, H-4ax), 2,26 (1H, m, H-4eq), 3,52 (1H, m, H-3), 5,35 (1H, m, H-6)¹³. Del compuesto **2** (CDCl_3 , 500 MHz) δ ppm: 0,71 (3H, s, H-18), 0,81 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H-26), 0,82 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H-27), 0,83 (3H, t, $J = 6$ Hz, H-29), 0,90 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H-21), 1,38 (3H, s, H-19), 3,53 (1H, m, H-3), 5,03 (1H, dd, $J = 15,3, 8,5$ Hz, H-23), 5,15 (1H, dd, $J = 15,3, 8,55$ Hz, H-22), 5,35 (1H, m, H-6)¹⁴.

Compuesto 3 y 4.- Fue obtenido 9,4 mg, esta muestra se presenta como un sólido blanco. Fue identificada como una mezcla de estigmasta-7-en-3-ol (**3**) y estigmasta-7,22-dien-3-ol (**4**) por análisis de sus desplazamientos químicos de sus espectros de RMN- ^{13}C (tabla 4) y RMN- ^1H y por integración de sus señales se puede justificar que están en la relación de 1:7, respectivamente. Compuesto **3** (CDCl_3 , 500MHz) δ ppm: 0,55 (3H, s, H-18), 0,80 (3H, s, H-19), 0,81 (3H, d, $J = 6,1$ Hz, H-27), 0,83 (3H, d, $J = 6,1$ Hz, H-26), 0,86 (3H, t, $J = 7,63$ Hz, H-29), 0,94 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H-21), 3,61 (1H, m, H-3), 5,17 (1H, m, H-7). Compuesto **4** (CDCl_3 , 500MHz) δ ppm: 0,56 (3H, s, H-18), 0,81 (3H, s, H-19), 0,81 (3H, d, $J = 6,1$ Hz, H-23), 0,82 (3H, t, $J = 7,35$ Hz, H-29), 1,04 (3H, d, $J = 6,72$ Hz, H-21), 3,6 (1H, m, H-3), 5,04 (1H, dd, $J = 8,55, 15,25$ Hz, H-23), 5,15 (1H, m, H-7), 5,17 (1H, dd, $J = 8,55, 14,95$ Hz, H-22)¹⁵.

Compuestos 5.- Fue obtenido 7,2 mg de un sólido de color amarillo claro, fue identificado como el éster metílico del ácido ferúlico a través del análisis de sus desplazamientos químicos de sus espectros de RMN- ^{13}C (tabla 4) y RMN- ^1H (CDCl_3 , 500MHz) δ ppm: 3,81 (3H, s, H-1''), 3,94 (3H, s, 3-OMe), 6,29 (1H, d, $J = 15,9$ Hz, H-2'), 6,93 (1H, d, $J = 8,25$ Hz, H-5), 7,04 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-2), 7,08 (1H, dd, $J = 8,5, 1,55$ Hz, H-6), 7,63 (1H, d, $J = 16,15$ Hz, H-1')¹⁶.

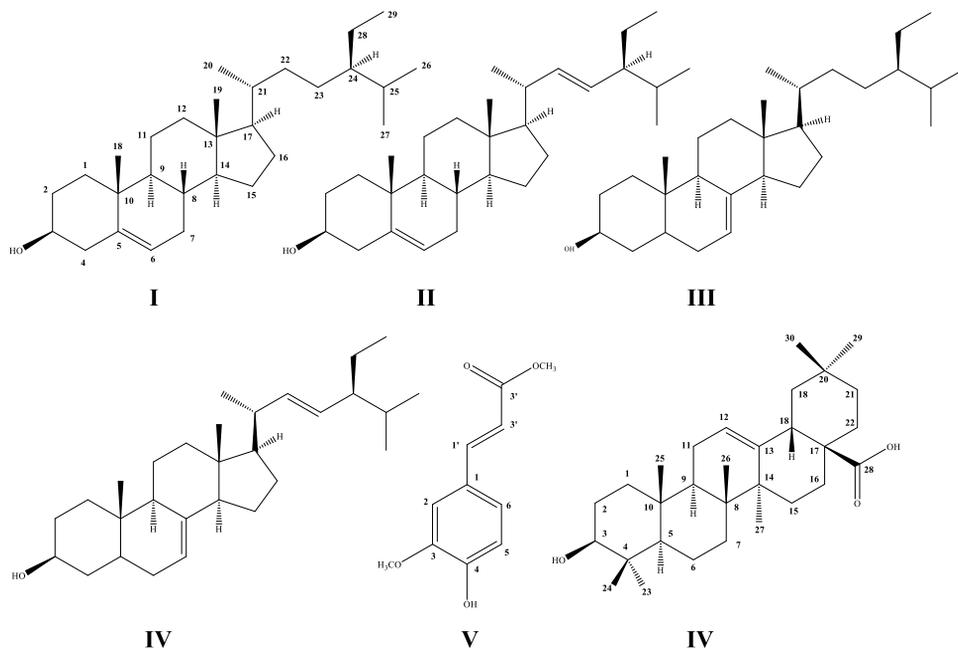


Figura 3. Moléculas identificadas en el zumo de la raíz de *C. parviflora* subsp. *biumbellata*. (sitosterol **1**, estigmasterol **2**, estigmasta-7-en-3-ol **3**, estigmasta-7,22-dien-3-ol **4**, éster metílico del ácido ferúlico **5** y ácido oleánico **6**).

Compuesto 6.- Se obtuvo 12 mg de un polvo crema. Fue identificado como ácido oleánico por análisis de sus desplazamientos químicos de sus espectros de RMN- ^{13}C (tabla 4) y RMN- ^1H (CD_3OD , 500MHz) δ ppm: 0,78 (3H, s, H-25), 0,83 (3H, s, H-29), 0,91 (6H, s, H-24 y 30), 0,95 (3H, s, H-26), 0,98 (3H, s, H-23), 1,16 (3H, s, H-27), 2,85 (1H, dd, $J = 13,7, 4$ Hz, H-18), 3,15 (1H, dd, $J = 11,6, 4,9$ Hz, H-3), 5,24 (1H, dd, $J = 3,7, 3,35$ Hz, H-12)¹⁷.

Tabla 4. Desplazamiento químico del RMN de ^{13}C (δ ppm, 125 MHz) de las moléculas identificadas en el zumo de la raíz de *C. parviflora* subsp. *biumbellata*.

C	1	2	3	4	6	C	5
	CDCl_3			CD_3OD			CDCl_3
1	37,28	37,28	37,17	31,17	38,34	1	126,99
2	31,68	31,88	31,52	31,52	26,56	2	109,36
3	71,84	71,84	71,08	71,08	79,89	3	146,75
4	42,24	42,32	37,17	38,03	38,34	4	147,97
5	140,77	140,77	40,29	40,29	56,94	5	114,71
6	121,72	121,72	29,66	29,66	19,68	6	123,03
7	31,93	31,93	117,47	117,47	33,22	1'	144,92
8	31,93	31,93	139,58	139,58	40,00	2'	115,21
9	50,16	50,25	49,48	49,48	47,94	3'	167,68
10	36,53	36,53	34,25	34,25	37,08	1''	55,94
11	21,07	21,04	21,57	21,57	24,17	3OMe	55,94
12	39,80	39,71	39,48	39,48	123,68		
13	42,24	42,32	43,29	43,29	145,55		
14	56,79	56,88	55,06	55,14	42,99		
15	24,32	24,38	23,02	23,02	28,04		
16	28,26	28,91	27,97	24,49	24,69		
17	56,09	55,99	56,12	55,94	47,52		
18	11,86	11,99	11,85	12,05	43,08		
19	19,39	19,39	13,04	13,04	47,52		
20	36,53	40,47	36,59	40,81	31,78		
21	18,79	21,22	18,99	21,38	34,06		
22	33,59	138,31	33,93	138,16	33,76		
23	26,12	129,30	27,19	129,48	28,91		
24	46,03	45,87	45,87	51,26	16,45		
25	29,14	33,97	29,20	31,88	16,04		
26	19,81	18,98	19,8	21,07	17,94		
27	19,39	21,21	18,99	18,99	26,56		
28	22,69	25,40	23,02	25,4	181,33		
29	12,25	12,05	12,05	12,25	34,21		
30	-	-	-	-	24,29		

CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico de las raíces de *Colignonia parviflora* subsp. *biumbellata* condujo a la identificación de 25 compuestos químicos en el aceite esencial, 3 ésteres metílicos en la fase apolar del zumo de la raíz y 6 metabolitos secundarios, que son compuestos ya identificados en otras plantas como lo demostramos al comparar los desplazamientos químicos de los metabolitos con la literatura correspondiente. Asimismo, los resultados obtenidos con este trabajo son por primera vez reportados para *C. parviflora* subsp. *biumbellata*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Química y Textil (II-FIQT) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo de investigación (Proyecto de Investigación Formativa 2019 código: CPDI1-2019-2).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Giuliatti AM, Nogueira MGC. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Nyctaginaceae. *Rodriguésia*. 2017; 68(3): 1045 – 1051.
2. León B. Nyctaginaceae endémicas del Perú. *Rev Perú Biol*. 2006; 13(2): 469s – 470s.
3. Beltrán H. Catálogo de flora vascular del distrito de Laraos (Yauyos, Lima). *Arnaldoa*. 2018; 25(2): 565 – 596.
4. Aredo V, Carranza-Cabrera J, Siche R. Inventario de especies vegetales de la Libertad (Perú) y análisis de su potencial agroindustrial. *Agroindustrial Science*. 2017; 7(2): 87-104.
5. Ministerio del Ambiente Perú. Indicadores Ambientales Moquegua. Díaz VM, Chambe HP. Primera edición. Lima: Serie Indicadores Ambientales. 2013; 252pp.
6. De Feo V, Paciente S, Pizza C, Soria RU. Saponins from *Colignonia scandens* Benth. (Nyctaginaceae). *Biochem Syst Ecol*. 1998; 26(2): 251 - 253.
7. Ministerio de Saude. Farmacopeia brasileira, 4 ed. Parte II, fascículo 2. In *Diario Oficial, Suplemento N° 1*, 2001.
8. De Oliveira TS, Bombo AB, De Oliveira ASS, Garcia VL, Appezzato-da-Glória B. Seasonal variation of the essential oil from two Brazilian native *Aldama La Llave* (Asteraceae) species. *An Acad Bras Ciênc*. 2016; 88(3 Suppl.): 1899 - 1907.
9. Gusmão DF, Estork DM, Paciencia MLB, Díaz IEC, Frana SA, Rodrigues PA, et al. Preliminary evaluation of the acute toxicity related to *Abarema auriculata* to mice and investigation of cytotoxicity of isolated flavonones. *PharmacologyOnline*. 2013; 30(1): 113 - 127.
10. Díaz IEC, Gonçalves EG, Marques MOM, Yoshida M. Incidencia de ácidos grasos en especies de Araceas. *Rev Soc Quím Perú*. 2011; 77(4): 275 - 284.
11. Moretto E, Fett R. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*. Primeira edição. São Paulo, Brasil: Valera editora e livraria Ltda; 1998, 150pp.
12. De Almeida SCX, De Lemos TLG, Silveira ER, Pessoa ODL. Constituintes químicos voláteis e não voláteis de *Cochlospermum vitifolium* (Willdenow) Sprengel. *Quím Nova*. 2005; 28(1): 57 – 60.
13. Abdullah NH, Salim F, Ahmad R. Chemical constituents of Malaysian *U. cordata* var. *ferruginea* and their *in vitro* α -glucosidase inhibitory activities. *Molecules*. 2016; 21(5): 525.
14. Chaturvedula VSP, Prakash I. Isolation of stigmaterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *Int Curr Pharm J*. 2012; 1(9): 239 – 242.

15. Kojima H, Sato N, Hatano A, Ogura H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris* Phytochem. 1990; 29(7): 2351-2355.
16. Li N-G, Shi Z-H, Tang Y-P, Li B-Q, Duan J-A. Highly efficient esterification of ferulic acid under microwave irradiation. Molecules. 2009; 14(6): 2118 – 2126.
17. De Sousa LRF, Santos MHF, Severino VGP, Severino RP, Viera PC. New degraded quinone diterpenoid from the stems of *Byrsonima coccolobifolia* Kunth (Malpighiaceae) Quím Nova 2018; 41(2): 184 – 188.

DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTO DE SEMILLAS DE UVAS RESIDUOS DE LA PRODUCCIÓN DE PISCOS

Felipe Surco-Laos^{1*}, Hilda Ayquipa Paucar¹, Wilfredo Quispe Gamboa¹,
Jorge García Ceccarelli¹, Manuel Valle Campos¹

RESUMEN

Las uvas pisqueras son 8 variedades conocidas de *Vitis vinifera* de las cuales se obtiene el pisco. Durante el proceso de producción del pisco se desprenden del fruto subproductos como las semillas, hollejos y otros; las semillas últimamente están cobrando especial importancia debido a su alto contenido en polifenoles y sus propiedades antioxidantes. Existen diversos métodos para la obtención de extractos y con el fin de obtener extractos con el mayor contenido de polifenoles posibles, en este estudio se hace uso de un baño ultrasonido con un sistema de solvente etanol: agua: ácido acético (90/9,5/0,5), el cual luego se lleva a sequedad en un evaporador rotatorio. Se determinó el índice de polifenoles totales encontrándose entre 402 a 84/g de semilla, índice de compuestos flavonoides de 9 a 42/g de semilla; la actividad antioxidante por el método de DPPH expresado como IC₅₀ entre 0,184 a 0,858 mg de extracto y por el método FRAP expresado como mM equivalente de trolox de 0,298 a 1,178 mg de extracto de las distintas variedades, respectivamente. El resultado obtenido nos permite proyectar la recuperación de estos residuos como posibles sustancias nutracéuticas.

Palabras clave: Semillas, *Vitis vinifera*, compuestos polifenólicos, actividad antioxidante.

PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GRAPE SEEDS RESIDUES OF PISCO PRODUCTION

ABSTRACT

Pisco grapes are 8 known varieties of *Vitis vinifera* from which pisco is obtained during the pisco production process, by-products such as seeds, skins and others are released from the fruit; the seeds are lately becoming especially important due to their high content of polyphenols and their antioxidant properties. There are several methods for obtaining extracts and in order to obtain extracts with the highest possible polyphenol content in this study, an ultrasonic bath with a solvent system ethanol: water: acetic acid (90/9.5/0.5) is used, which

¹ Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Av. Los Maestros s/n Ica.
felipesurco@gmail.com

is then taken to dryness in a rotary evaporator. The Total Polyphenols index was determined to be between 402 to 84 μg of seed, flavonoid compound index of 9 to 42 μg of seed; the antioxidant activity by the DPPH method expressed as IC_{50} between 0.184 to 0.858 mg of extract and by the FRAP method expressed as mM equivalent of trolox from 0.298 to 1.178 mg of extract of the different varieties respectively. The results obtained allow us to project the recovery of these wastes as possible nutraceutical substances.

Key words: Seeds, *Vitis vinifera*, polyphenolic compounds, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

Se consideran alimentos funcionales aquellos que aportan nutrientes que cubran las necesidades nutricionales de las personas que los consumen, además de beneficios a la salud. Un alimento considerado funcional es la uva, a la que se le atribuye múltiples cualidades debido a la presencia de compuestos polifenólicos, en especial la actividad antioxidante^{1,2,3}. Estos compuestos polifenólicos se clasifican de manera general como fenoles y ácidos fenólicos (polifenoles no flavonoides), y flavonoides⁴. Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas que se han asociados con diversas propiedades, taxonómicas, sensoriales, nutricionales y farmacológicas⁵. En muchos frutos se ha encontrado un mayor poder antioxidante en las cáscaras y/o semillas que en la porción comestible. En el proceso de la producción del pisco queda como residuo un bagazo, compuesto principalmente por semillas y hollejos que son fuentes importantes de estos compuestos. Es así como la abundante cantidad de estos residuos no tienen mayor provecho, a pesar de la importancia económica que podrían tener por su contenido de compuestos polifenólicos y posible capacidad antioxidante, como lo demuestran estudios en otras variedades como: Cabernet sauvignon⁶⁻⁸, Carménere⁵, Malvasía y Tempranillo⁹. A pesar de lo antes dicho no hay mayores estudios a nivel nacional que se oriente a una utilización integral de estos subproductos.

Tradicionalmente, la extracción de compuestos fenólicos se ha realizado por diferentes técnicas que involucran diversos solventes orgánicos de naturaleza polar como: agua, metanol, etanol, acetato de etilo, o mezclas de ellos⁵. La aplicación de ondas de ultrasonido de alta intensidad es considerada como una técnica de alto rendimiento en la extracción, al facilitar el pase de metabolitos desde el interior de las células al solvente de extracción¹⁰. El pisco, bebida alcohólica destilada de origen peruano, se produce a partir de las variedades "Torontel, Italia, Mollar, Quebranta, Negra criolla, Albilla, Moscatel y Uvina"¹¹. En el afán de realizar un aprovechamiento integral de los subproductos del proceso, el presente estudio tiene como objetivo la determinación de polifenoles totales y actividad antioxidante del extracto de semillas de las distintas variedades de uvas pisqueras, tratando de maximizar dicha extracción mediante el uso de un baño de ultrasonido.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de semillas

Las semillas de uvas de las variedades: Italia, Torontel, Moscatel, Quebranta y Mollar se obtuvieron del bagazo de uvas cultivadas en el CITE agroindustrial de Ica empleadas para la obtención de piscos; la variedad de uva Albilla fue obtenida de una bodega del distrito de Guadalupe-Ica, la variedad Uvina del fundo La Cantera del distrito Nuevo Imperial-Cañete y la variedad Negra criolla de agroindustrias Yugo SAC del departamento de Tacna, todas estas muestras se obtuvieron entre los meses de febrero a abril del 2019.

Tratamiento de semillas

Los bagazos fueron secados por 7 días al sol y posteriormente 7 días bajo sombra para luego proceder a extraer las semillas manualmente, separándolas de pieles y escobajo. Una porción de cada una de las variedades fue procesada en un molino analítico (Ica A11) y tamizada (tamiz de 20 mesh). Las muestras (polvo de las semillas) fueron almacenadas en frascos de color ámbar a -5 °C hasta el momento de los análisis respectivos.

Caracterización de semillas

La caracterización de las semillas de las variedades de uvas pisqueras se basó en un análisis químico proximal y determinación de micronutrientes minerales por métodos oficiales según AOAC¹².

Obtención de extracto

Para la obtención de los extractos se realiza un desengrasado previo de polvo de semilla de cada variedad, el cual consistió en tomar 10,00 +/- 0,02 g, se somete a una extracción sólido-líquido con éter de petróleo por espacio de 8-10 horas según Jayaprakasha 2003¹³, Una vez desengrasada la muestra se realiza una extracción sólido-líquido en un equipo de baño ultrasonido¹⁰, utilizando como solvente de extracción la mezcla etanol: agua: ácido acético (90,00/9,50/0,50). Se deposita en un vaso de precipitado 10 g de muestra y 90 mL del solvente de extracción, se coloca el baño de ultrasonido a alta frecuencia por espacio de 30 minutos, a una temperatura entre 30-35 °C, luego se filtra el sobrenadante, con el residuo se procede a repetir el proceso por 2 veces más; se reúnen los extractos y se concentra en un evaporador rotatorio (Büchi R-210) a 40 °C para eliminar el exceso de solvente, concentrándose hasta 50 mL. El extracto obtenido fue almacenado en frasco de color ámbar en refrigeración (5-8 °C) hasta su análisis⁶.

Determinación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se cuantificaron de acuerdo con la reacción que presentan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (tungstofosfato y molibdofosfato), el cual se reduce en solución alcalina, formando un producto de color azul que puede ser detectado a 760 nm⁷. Los datos fueron interpolados con la curva de calibración realizada con el ácido gálico (Sigma-Aldrich) como estándar. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico/g semilla.

Índice de polifenoles totales (IPT)

La obtención del índice de polifenoles totales se realizó por la medida de la absorbancia a 280 nm (UV) del extracto acuoso diluido, de acuerdo a la absorbancia característica del núcleo bencénico propio de los compuestos polifenólicos. El extracto obtenido se diluye 1:100 con agua ultrapura (millipore) y se realiza la medida de absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Uv-vis con una celda de cuarzo. El índice se calcula como:

$IPT = Abs_{(280)} \times 100$ y se realiza el cálculo respectivo para reportar el índice por gramo de semilla⁸.

Índice de contenido de flavonoles

El contenido de flavonoles se estima por la medida de la absorbancia a 365 nm. El extracto se diluye 1:100 con agua ultrapura (millipore) y se realiza la medida de absorbancia. El índice de flavonoles se calcula como:

$ICF = Abs_{(362)} \times 100$ y se realiza el cálculo respectivo para reportar el índice por gramo de semilla⁸.

Determinación de actividad antioxidante por el método DPPH

La capacidad de captación del radical libre DPPH fue determinada siguiendo el método descrito por Brand Williams, con pequeñas modificaciones. Se prepara una solución del radical libre DPPH a una concentración 100 mM en metanol y se determina su absorbancia a 517 nm (la absorbancia debe estar entre 0,9 y 1,1). 0,1 mL de solución de los extractos de diferentes concentraciones fueron adicionada a 2,9 mL de la solución metanólica de DPPH, se agita en un vortex y se deja reposar en la oscuridad por 30 minutos. Una muestra control con el mismo volumen del solvente fue usado como blanco. Después de la reacción, la absorbancia fue medida a 517 nm para determinar la absorbancia remanente de la solución de DPPH. El porcentaje de inhibición de la absorbancia del radical DPPH es calculada como:

$$\%Inh = ((Abs_{blanco} - Abs_{muestra}) / Abs_{blanco}) \times 100$$

El valor de IC50 es calculado usando una ecuación de regresión del porcentaje de inhibición para comparación¹⁴.

Determinación de la actividad antioxidante por método FRAP

Se siguió el procedimiento descrito por Benzie y Strain, con ligeras modificaciones. Para iniciar el análisis se prepara el reactivo de trabajo, que consiste en una mezcla de tampón acetato de sodio 300 mM (pH = 3,6), 2, 4, 6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM y tricloruro férrico (FeCl₃ · 6H₂O) 20 mM en una proporción 10:1:1 (v:v:v). Una vez preparado, se añade 3 mL de este reactivo en una cubeta, y se mide la absorbancia a 593 nm. Posteriormente, se agrega 100 µL de cada una de las soluciones de los extractos de diferentes concentraciones y se agita en un vórtex durante 30 segundos. Después de 6 minutos de incubación a temperatura ambiente se realiza la lectura de absorbancia nuevamente a 593 nm, a la que se resta el valor de la absorbancia inicial. Las muestras se ensayarán por triplicado. De manera similar se trabaja con soluciones de Trolox en un rango de 0,0625 a 1 mM como patrón de comparación, con los valores se realiza una curva de regresión frente a la cual se extrapolan los valores de las muestras. La actividad se expresa como mM equivalentes de trolox (TEAC)¹⁵.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Determinación del análisis químico proximal de las semillas de uvas pisqueras (g/100g).

Variedad de uva	Humedad	Cenizas	Proteína	Grasa	Carbohidratos
Mollar	7,18 ± 0,14 ^c	2,20 ± 0,02 ^c	11,24 ± 0,87 ^a	9,73 ± 0,62 ^b	69,65
Negra criolla	7,64 ± 0,23 ^c	2,00 ± 0,03 ^c	10,08 ± 0,63 ^a	5,16 ± 0,72 ^d	75,12
Quebranta	11,47 ± 0,04 ^a	1,79 ± 0,02 ^d	8,48 ± 0,28 ^b	6,29 ± 0,54 ^c	71,97
Uvina	8,30 ± 0,26 ^b	2,77 ± 0,04 ^a	9,99 ± 0,45 ^a	8,56 ± 0,43 ^b	70,38
Moscatel	7,41 ± 0,21 ^c	2,57 ± 0,04 ^b	8,92 ± 0,17 ^b	11,20 ± 0,28 ^a	69,90
Torontel	7,55 ± 0,13 ^c	2,40 ± 0,03 ^b	9,40 ± 0,23 ^b	7,18 ± 0,32 ^c	73,47
Italia	7,38 ± 0,09 ^c	2,47 ± 0,02 ^b	7,79 ± 0,28 ^c	7,14 ± 0,63 ^c	75,22
Albilla	8,37 ± 0,16 ^b	2,17 ± 0,03 ^c	9,22 ± 0,25 ^b	9,26 ± 0,37 ^b	70,98

Letras iguales significa que no hay diferencia estadística.

El valor de carbohidratos por cálculo

Tabla 2. Contenido de micronutrientes minerales en semillas de uvas pisqueras.

Variedad de uva	Micronutrientes					
	Ca mg/kg	Mg mg/kg	Fe mg/kg	Zn mg/kg	K mg/100g	P mg/100g
Mollar	2283 ± 76,1 ^b	871 ± 9,6 ^d	69,2 ± 4,3 ^c	14,0 ± 3,0 ^b	187 ± 6,1 ^d	934 ± 5,6 ^b
Negra criolla	1206 ± 34,2 ^e	1102 ± 31,4 ^c	67,3 ± 4,9 ^c	12,9 ± 1,7 ^c	468 ± 22,4 ^a	667 ± 11,3 ^c
Quebranta	2497 ± 73,5 ^b	887 ± 21,0 ^d	84,2 ± 2,4 ^b	10,1 ± 0,9 ^c	199 ± 7,8 ^d	697 ± 23,2 ^c
Uvina	1848 ± 45,4 ^c	1227 ± 31,2 ^c	104 ± 5,9 ^a	17,9 ± 2,6 ^a	436 ± 11,3 ^b	1199 ± 24,3 ^a
Moscatel	1500 ± 61,1 ^d	2405 ± 16,9 ^a	62,0 ± 2,8 ^d	12,1 ± 1,1 ^c	241 ± 5,7 ^c	519 ± 35,6 ^d
Torontel	1342 ± 24,3 ^e	1066 ± 31,4 ^d	63,2 ± 4,5 ^d	11,2 ± 0,7 ^c	284 ± 12,4 ^c	624 ± 31,1 ^c
Italia	1123 ± 35,7 ^d	1303 ± 17,5 ^c	68,5 ± 2,1 ^c	12,4 ± 0,9 ^c	414 ± 8,1 ^b	703 ± 23,8 ^b
Albilla	3054 ± 31,4 ^a	2005 ± 32,6 ^b	72,5 ± 2,9 ^c	17,5 ± 2,4 ^a	492 ± 14,2 ^a	570 ± 25,6 ^d

Letras iguales significa que no hay diferencia estadística.

Tabla 3. Rendimiento de extracto de las semillas de uvas pisqueras.

Variedad de uva	Rendimiento		
	Peso de semilla (g)	Peso seco de extracto (g)	Porcentaje en g/100g
Quebranta	10,00	0,3341	3,34 ± 0,07 ^a
Mollar	10,01	0,2523	2,52 ± 0,04 ^b
Uvina	10,03	0,261	2,60 ± 0,07 ^b
Negra criolla	10,01	0,1884	1,88 ± 0,12 ^c
Moscatel	10,04	0,3955	3,95 ± 0,07 ^b
Torontel	10,07	0,1855	1,86 ± 0,04 ^d
Italia	10,01	0,248	2,48 ± 0,07 ^c
Albilla	10,03	0,544	5,44 ± 0,12 ^a

Letras iguales significa que no hay diferencia estadística.

Tabla 4. Determinación de índice de polifenoles totales, polifenoles totales e índice de compuestos flavonoides en extracto de semillas de uvas pisqueras

Variedad de uva	Compuestos polifenólicos		
	IPT/g semilla	Polifenoles totales mgEAG/g	ICF/g semilla
Quebranta	210,5 ± 6,7 ^b	1,96 ± 0,07 ^c	24,5
Mollar	171,8 ± 4,2 ^c	2,31 ± 0,05 ^b	27,5
Uvina	226 ± 6,8 ^b	1,61 ± 0,08 ^d	33
Negra criolla	44,5 ± 0,9 ^c	0,32 ± 0,03 ^e	9
Moscatel	402,7 ± 6,7 ^a	2,53 ± 0,09 ^a	42,3
Torontel	84 ± 4,2 ^d	1,26 ± 0,05 ^d	13,5
Italia	222 ± 6,8 ^b	2,08 ± 0,08 ^b	31
Albilla	52,5 ± 0,9 ^c	1,94 ± 0,03 ^c	9,5

Letras iguales significa que no hay diferencia estadística.

Tabla 5. Determinación de la actividad antioxidante en los extractos de semillas de uvas pisqueras

Variedad de uva	Actividad antioxidante	
	DPPH IC ₅₀ /mg de extracto	FRAP mg extracto/mMTE
Quebranta	0,375 ± 0,023 ^b	0,707 ± 0,019 ^b
Mollar	0,345 ± 0,027 ^b	0,675 ± 0,021 ^b
Uvina	0,184 ± 0,014 ^d	0,220 ± 0,012 ^e
Negra criolla	0,858 ± 0,027 ^a	1,178 ± 0,034 ^a
Moscatel	0,208 ± 0,013 ^d	0,427 ± 0,013 ^e
Torontel	0,194 ± 0,017 ^d	0,298 ± 0,021 ^d
Italia	0,282 ± 0,024 ^c	0,399 ± 0,012 ^e
Albilla	0,260 ± 0,049 ^c	0,423 ± 0,023 ^e

Letras iguales significa que no hay diferencia estadística.

En el presente estudio se investigó el contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante en el extracto de semillas de las ocho variedades de uvas utilizadas para la producción de pisco, producto de bandera peruano. Las semillas de las variedades Torontel, Moscatel, Albilla, Italia, Quebranta, Mollar y Uvina fueron obtenidas inmediatamente después de la expresión para obtener el mosto respectivo; mientras que la variedad Negra criolla se obtuvo después de días del proceso de fermentación del mosto (como es costumbre la fermentación en la región de Tacna). Todos los bagazos fueron secados de manera similar al sol y luego bajo sombra pretendiendo neutralizar los posibles procesos enzimáticos remanentes. En las tablas 1 y 2 se observa los valores de las determinaciones químico proximal y minerales realizadas a las semillas de cada variedad de uvas pisqueras, siendo mayores a los valores de la variedad Cabernet Sauvignon reportado por Mojica y Pérez *et al* 2019⁸ (en cenizas y nitrógeno llevados a base seca), estas determinaciones se realizaron con el objetivo de caracterizarlas; sin embargo, estos valores se deben tomar con precaución, ya que son resultados de la producción de un mismo año y zona. Teniendo conocimiento que las extracciones por ultrasonido mejoran los rendimientos de los metabolitos secundarios¹⁰, para obtener una mayor riqueza polifenólica y actividad antioxidante de los extractos se fijaron los valores experimentales como temperatura 30-35 °C, la intensidad de ultrasonido (alta intensidad del equipo) y el tiempo de extracción fue de 30 minutos en cada extracción (se realizó tres extracciones por muestras). En la tabla 3, se aprecia que los valores del rendimientos de los extractos varían en cada una de las variedades, va de 1,88 a 5,43 %, lo que podemos atribuir a la naturaleza misma de las semillas, puesto que todas fueron sometidas a similar procedimiento, Berradre *et al* 2013⁹ encontraron un rendimiento entre 5 y 6 % en las variedades Tempranillo y Malvasía por el método de Soxhlet con una variación entre 7 a 9 horas de extracción, con

una diferencia en el solvente pues usaron metanol a diferencia del presente trabajo donde usamos el etanol, pero Jayaprakasha *et al* 2003¹³ también señalan un rendimiento entre 5 y 6 % empleando diferentes tipos de solventes. Respecto al índice de polifenoles totales e índice de compuestos flavonoides la variedad Moscatel resultó con mayores valores, seguida de la Uvina, con valores dentro de los reportados en otros estudios^{9,13}; Mojica y Pérez reportan para la variedad Cabernet valores de IPT menor (117) y ICF valor promedio (33) que la mayoría de los casos de este estudio; en la determinación de polifenoles totales se encontró una coincidencia en la variedad de mayor contenido (Moscatel) y de menor contenido (Negra criolla) con respecto a las determinaciones de índice de fenoles y flavonoides, en lo referente al contenido de polifenoles totales los valores encontrados son menores a lo reportado por Mojica y Pérez 2019 (12,3 mg/g pero determinado en orujo)⁸. La actividad antioxidante, como se muestra en la tabla 5, todos los extractos muestran que tienen capacidad de inhibitoria del radical DPPH, siendo los más activos Uvina y Moscatel al presentar menores valores de IC₅₀, lo que se puede correlacionar con presencia de compuestos bioactivos según la tabla anterior, y la variabilidad de los resultados podría deberse a los diferentes tipos de compuestos polifenólicos que presenten cada variedad de uva, o que estos compuestos se encuentren enlazados a otros tipos de sustancias que lo hagan más insolubles o complejos, para permitirles una reacción directa con el radical DPPH. Considerando el mecanismo de reacción por lo cual actúa este radical nos permite suponer la presencia de sustancias que actúan como dadores de átomos de hidrógenos, así como captadores de electrones libres. La actividad antioxidante por el método FRAP es uno de los más usados para probar el poder reductor de los compuestos antioxidantes; sin embargo, los valores obtenidos no pueden ser extrapolados a condiciones fisiológicas, en la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos por este método en los extractos de semillas, siendo más efectivas las variedades Uvina y Torontel al requerir menos miligramos del extracto para alcanzar una equivalencia de un milimol de trolox, lo que nos indica que poseen compuestos donadores de electrones, que es el mecanismo en que se basa este método. El mayor valor de equivalente de trolox obtenido en la variedad Negra criolla podría explicarse por el hecho que al estar sometidas al proceso de fermentación en la presencia de ácidos y diversas enzimas liberan mayor cantidad de estos compuestos hacia el mosto quedando ellas deficientes¹⁶.

CONCLUSIONES

Los resultados nos permiten concluir que la semilla de uvas de mayor rendimiento, desde el punto de vista del análisis químico proximal y mineral, es la variedad Albilla, y que los extractos de semillas poseen una alta capacidad antioxidante, sobresaliendo la variedad Torontel y Uvina, lo cual se relaciona con el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, lo que nos lleva a considerarlas como alimentos funcionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Trescastro-López E, Bernabeu-Mestre J. Alimentos funcionales: ¿necesidad o lujo? Rev Esp Nutr Hum Diet. 2015; 19(1): 1 - 3.
2. Cano M, Sánchez-Moreno C, Pascual-Teresa S, Ancos B. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Guadalajara, México: Logiprint Digital; 2005 pp. 289-312.
3. Molina-Quijada D, Medina-Juárez L, Gonzales-Aguilar L, Robles-Sánchez R y Gámez-Meza N. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera* L) de mesa cultivada en el noreste de México. CyTA - J Food. 2010; 8 (1): 57-63.
4. Gallego J. Servicios de vinos. Madrid:Ediciones Paraninto S.A.; 2011.
5. Cerda A. Caracterización polifenólica y de la capacidad antioxidante de orujos de cuatro variedades de *Vitis vinifera* L. [Tesis de pregrado]. Santiago de Chile: Universidad de Chile; 2014.
6. Paladino S, Zuritz C. Extracto de semillas de vid (*Vitis vinifera* L.) con actividad antioxidante: eficiencia de diferentes solventes en el proceso de extracción. Rev FCA UNCUYO. 2011; 43: 187-199.
7. Ainsworth EG. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using folin-Ciocalteu reagent. Nat Protocol. 2007; 2: 875-877.
8. Mojica J, Pérez W. Aprovechamiento de residuos agroindustriales de la industria vinícola del valle de Sáchica. [Internet]. Servicio Nacional de Aprendizaje. SENA 2019. [accesado 12 ene 2019]. Disponible en. https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/5389/1/aprovechamiento_residuos_agro_vinicola_sachica.pdf
9. Berradre M, Gonzales C, Sulbarán B, Fernández V. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de extractos de semilla de uva (*Vitis vinifera*) variedad Malvasía y Tempranillo. Rev Fac Agron (LUZ). 2013; 30: 613-631.
10. Acosta J, Salomón S, Sevilla I, Nuevas L. Empleo del ultrasonido para la extracción de fracción apolar en hojas de *Mangifera indica* L. (árbol del mango). Rev Cubana Plant Med. 2016; 21 (3): 261-271.
11. INDECOPI. Norma Técnica Peruana 211.001-2006 –. Bebidas Alcohólicas. Pisco. Requisitos.
12. AOAC. Official Methods of Analysis. 18th Edition. Gaithersburgs, MD:Association of Official Analytical Chemists; 2006.
13. Jayaprakasha G, Selvi T, Sakariah K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. Food Res Int. 2002; 36 (2): 117-122.
14. Surco-Laos F, Tipiana R, Torres Y, Valle M, Panay J. Efectos de liofilización sobre composición química y capacidad antioxidante en pulpa de cuatro variedades de *Mangifera indica*. Rev Soc Quím Perú. 2017; 83(4): 412-419.
15. García A, De Pascual T, Santos C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. Food Chem. 2004; 84 (1): 13-18.
16. Li H, Wang X, Li P, Li Y, Wang H. Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. J Food Drug Anal. 2008; 6 (6): 1041-1049.

ESTUDIO DE LA COAGULACIÓN DE PARTÍCULAS COLOIDALES DE AgI POR INFLUENCIA DE QUITOSANO CON SULFATO DE ALUMINIO

Miguel Alleca Chulca^a, Nelson Tapia Huananbal^{*a,b}, Claudia Villanueva Huerta^a,
Enrique Guzmán Lezama^{a,b}, Patricio Muñoz Huillcas^a, Neptalí Ale Borja^a,
Holger Maldonado García^a

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar las condiciones óptimas de la coagulación de partículas suspendidas de yoduro de plata de carga negativa por la acción de soluciones de quitosano, sulfato de aluminio, así como la acción mixta de ambos coagulantes. La suspensión de partículas coloidales de AgI se obtuvo mediante la mezcla de soluciones diluidas de KI y AgNO₃ en exceso de KI. En todos los experimentos el volumen del sistema coloidal fue de 600 mL y pH= 6. Los parámetros óptimos del proceso de coagulación se determinó a base del método de Test de Jarras. Para la solución de quitosano los parámetros óptimos fueron: concentración 0,01 %, pH=4,5 y un volumen de 25 mL; para el sulfato de aluminio: concentración 30 ppm, pH=4,0 y un volumen 25 mL. En el caso de la acción mixta de ambos coagulantes los parámetros óptimos fueron 5 mL de una solución al 30 ppm de sulfato de aluminio a pH 4,0 y 20 mL de una solución de quitosano al 0,01 % a pH=4,5 . A base de estos parámetros, se estudió la cinética del proceso de coagulación de la suspensión de AgI mediante el método de turbidimetría y se determinó que el proceso de coagulación fue rápido y culminó aproximadamente a los 3 minutos de haber empezado el proceso.

Palabras clave: biopolímero, coagulación, floculación, quitosano.

STUDY OF THE COAGULATION OF COLOIDAL PARTICLES OF AgI UNDER THE INFLUENCE OF CHITOSAN WITH ALUMINUM SULFATE

ABSTRACT

The objective of the present work was to determine the optimal conditions for the coagulation of suspended particles of silver iodide of negative charge by the action of solutions of chitosan, aluminum sulfate and the mixed action of both coagulants. The suspension of colloidal

^a Facultad de Quím. e Ing. Quím., Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima 1. ntapiah@unmsm.edu.pe

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

particles of AgI was obtained by mixing diluted solutions of KI and AgNO₃ in excess of KI. In all the experiments the volume of the colloidal system was 600 mL and pH= 6. The optimal parameters for the coagulation process were determined based on the Jar Test method. For the chitosan solution the optimal parameters were: concentration 0.01%, pH = 4.5 and a volume of 25 mL; for aluminum sulfate: concentration 30 ppm, pH = 4.0 and volume 25 mL. In the case of the mixed action of both coagulants, the optimal parameters were 5 mL of a 30 ppm solution of aluminum sulfate at pH 4.0 and 20 mL of a 0.01% chitosan solution at pH = 4.5. Based on these parameters, the kinetics for the coagulation process of the suspension of AgI was studied by means of the turbidimetry method and it was determined that the coagulation process was rapid and ended approximately 3 minutes after beginning of the process.

Key words: biopolymer, coagulation, flocculation, chitosan.

INTRODUCCIÓN

Las aguas naturales contienen impurezas y partículas suspendidas de diversos tamaños de origen mineral u orgánico, que son responsables de la turbidez y color del agua^{1,2}. Estos contaminantes causan serios problemas durante el proceso de potabilización del agua³.

Para sedimentar las partículas coloidales suspendidas en el agua se usa generalmente el proceso de coagulación y floculación⁴, que consiste en producir la sedimentación de las partículas mediante el uso de diferentes tipos de coagulantes inorgánicos, polímeros naturales y sintéticos. Entre los coagulantes inorgánicos, el más usado es el sulfato de aluminio⁵ por su bajo costo y manejo; sin embargo, después del proceso de floculación quedan trazas del ion de Al³⁺, las cuales pueden poner en riesgo la salud pública, debido a que este ion favorece el desarrollo del mal de Alzheimer⁶. El proceso de coagulación-floculación produce grandes volúmenes de lodos, que también dan lugar a problemas ambientales⁷, debido al uso de coagulantes inorgánicos y polímeros sintéticos⁸. En este aspecto, el uso de biopolímeros en el proceso de coagulación floculación es de gran importancia para evitar la contaminación con aluminio y polímeros sintéticos no biodegradables⁹.

El quitosano es un polisacárido que en su estructura contiene a grupos aminos y se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina. A pH inferior a 7, la mayoría de los grupos amina están protonados y pueden atraer cationes de metales⁹⁻¹¹ y también pueden unirse a partículas coloidales de carga negativa¹²⁻¹⁴. Esta propiedad se utiliza para producir la coagulación en redes, la cual determina que el quitosano se pueda utilizar como floculante en diferentes aplicaciones, tales como: sedimentación de suspensiones sólidos en la industria de alimentos, separación de microorganismos y colorantes de efluentes textiles¹⁵⁻¹⁷.

En el presente trabajo se ha determinado los parámetros óptimos del proceso de coagulación-floculación de partículas suspendidas de yoduro de plata de carga negativa en agua, producidas por los coagulantes: sulfato de aluminio, quitosano y soluciones mixtas de sulfato de aluminio con quitosano. Utilizando los parámetros óptimos de este proceso de

coagulación, se ha estudiado también la cinética del proceso de coagulación correspondiente a la acción mixta de estos coagulantes.

PARTE EXPERIMENTAL

Sistema coloidal de yoduro de plata (AgI)

Para preparar el sistema coloidal de yoduro de plata por el método de condensación química, se disolvió 3,320 g de AgNO_3 (Merck) en 2,4 L de agua destilada en un vaso de 3L de capacidad y en otro vaso se disolvió 1,698 g de KI (Merck) en 1,2 L de agua destilada. Estas soluciones se mezclaron en un agitador magnético (HANNA) durante 20 min.

Solución de quitosano y sulfato de aluminio

Se pesó 1,0 g de quitosano de alto peso molecular en polvo (Sigma - Aldrich) y se disolvió en una solución de 100 mL de ácido acético al 2 % mediante agitación constante con un agitador de paletas (HANNA) a 100 rpm durante 24 h.

Para preparar una solución de 1000 ppm de Al^{3+} , se pesó 12,33 g de sulfato de aluminio (Merck) y se disolvió en agua destilada en una fiola de un litro.

Determinación de la concentración óptima del quitosano

De la solución 1 % (W/V) de quitosano por dilución se prepararon las siguientes soluciones: 0,004 %; 0,008 %; 0,01 %; 0,015 %; 0,02 % y 0,03 % en fiolas de 100 mL. En los vasos del equipo de jarras se colocaron 600 mL del sistema coloidal, y se ajustó el pH a 6,0 con soluciones 0,1N de NaOH y HCl, utilizando un pH-metro Russell RL060P. A los seis vasos les se agregó sucesivamente 20 mL de las soluciones de quitosano preparadas anteriormente. Se procedió a agitar las soluciones a 100 rpm durante 3 min, y enseguida a 30 rpm durante 10 minutos, para luego dejarlo reposar durante 20 min, y después se midió la turbidez con un turbidímetro (HANNA - HI 93703). Los resultados se muestran en la figura 1. De la gráfica que se muestra en esta figura, se deduce que la concentración óptima de quitosano para producir la coagulación es 0,01 % a un pH=6 para este sistema coloidal.

Determinación del volumen óptimo de la solución 0,01 % de quitosano en la coagulación del sistema coloidal de AgI.

En los 6 vasos del equipo de jarras se colocaron 600 mL del sistema coloidal AgI. El pH de cada uno de los vasos se ajustó a 6 con soluciones 0,1 N de HCl y NaOH. Luego, a cada uno de los vasos de manera secuencial se agregó 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mL de la solución de quitosano al 0,01 %, y se procedió a agitar en el equipo de jarras a 100 rpm durante 3 min, y después a 30 rpm durante 10 minutos. Se dejaron reposar las muestras durante 20 min e inmediatamente se midió la turbidez, los resultados se muestra en la figura 3.

Determinación del pH óptimo de la solución 0,01 % de quitosano

Para determinar el efecto del pH de la solución óptima de quitosano al 0,01 % en el proceso de coagulación y floculación de las partículas coloidales de AgI, se prepararon en 6 fiolas de

25 mL soluciones de quitosano a diferentes pH: 3,0; 4,0; 4,5 ; 5,0; 5,5 y 6,0. Estas soluciones en forma consecutiva se agregaron a los 6 vasos del equipo de jarras que contenían 600 mL del sistema coloidal y se procedió a agitar las soluciones a 100 rpm durante 3 min y enseguida a 30 rpm durante 10 minutos, luego se dejó reposar la mezcla obtenida durante 20 min y se midió la turbidez. Los resultados se muestran en la figura 5.

Determinación de la concentración óptima de la solución de sulfato de aluminio

A partir de la solución de 1000 ppm de Al^{3+} por dilución en filolas de 100 mL, se prepararon soluciones de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 ppm. En los 6 vasos del equipo de jarras se colocaron 600 mL del sistema coloidal y se ajustó el pH a 6. Luego se agregó 20 mL de cada una de las soluciones de sulfato de aluminio a los 6 vasos mediante agitación constante a 100 rpm durante 3 min, y después a 30 rpm durante 10 min. Se dejaron reposar durante 20 min. Enseguida se tomaron muestras para medir la turbidez. Los resultados se muestran en la gráfica de la turbidez versus la concentración, figura 2. De esta gráfica se deduce que la concentración óptima del Al^{3+} es 30 ppm.

Determinación del volumen óptimo de la solución 30 ppm de sulfato de aluminio

Como la concentración óptima de Al^{3+} para producir la coagulación del sistema coloidal con partículas de AgI de carga negativa es 30 ppm, se preparó 1L de esta solución. En los 6 vasos del equipo de jarras se colocaron 600 mL del sistema coloidal de AgI y se ajustó el pH a 6,0. En seguida a cada uno de estos vasos en forma sucesiva se agregó 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mL de la solución de sulfato de aluminio y se procedió a agitar las soluciones primero a 100 rpm durante 3 min y después a 30 rpm durante 10 minutos. Se dejaron reposar las soluciones durante 20 min e inmediatamente se midió la turbidez. Los resultados se muestran en figura 4.

Determinación del pH óptimo de la solución 30 ppm de sulfato de aluminio

Para determinar el efecto del pH de la solución 30 ppm de Al^{3+} en el proceso de coagulación y floculación de las partículas coloidales de AgI, en 6 fiolas de 25 mL se prepararon soluciones de 30 ppm de Al^{3+} a diferentes pH: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 y 8,0. Estas soluciones, en forma consecutiva, se agregaron a los 6 vasos del equipo de jarras que contenían 600 mL del sistema coloidal, y se procedió a agitar las soluciones a 100 rpm durante 3 min, y enseguida a 30 rpm durante 10 minutos. Luego se dejó reposar la mezcla obtenida durante 20 min, y después se midió la turbidez. Los resultados se muestran en la figura 6.

Determinación de la proporción óptima entre el volumen de quitosano y sulfato de aluminio en el proceso de coagulación

Con la finalidad de determinar esta proporción, en los 6 vasos del equipo de jarras se colocaron 600 mL del sistema coloidal de AgI y se ajustó su pH a 6,0. En seguida se agregó 2,5, 5, 10, 15, 20 y 22,5 mL en forma secuencial de la solución de sulfato de aluminio al 30 ppm y pH=4,0. La mezcla obtenida se agitó durante 3 min a 30 rpm; luego se adicionó 22,5, 20, 15, 10, 5 y 2,5 mL de la solución 0,01 % de quitosano a un pH=4,5, y se procedió agitar la mezcla a 100 rpm durante 3 minutos, y después a 30 rpm durante 10 minutos. Se dejó reposar por 20 minutos y se midió la turbidez. Los resultados se muestran en figura 7.

Cinética de la coagulación del sistema coloidal de AgI

Para estudiar la cinética del proceso de coagulación, se colocó 600 mL del sistema coloidal de AgI en un vaso de 1L. En seguida se adicionó 5 mL de la solución de Al^{3+} de 30 ppm con un pH=4,0, agitando la mezcla a 30 rpm durante 3 min e inmediatamente se adicionó 20 mL de quitosano al 0,04 % a pH=4,5 y se procedió a agitar a 100 rpm por 3 minutos, y finalmente a 30 rpm por 10 minutos. Luego, se extrajeron periódicamente muestras de 20 mL de esta mezcla para determinar la turbidez. Los resultados se muestran en la figura 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proceso de coagulación en función de la concentración de quitosano y sulfato de aluminio

El quitosano es un polisacárido que se encuentran en gran abundancia en la naturaleza. En su estructura molecular contiene una gran cantidad de grupos amino ($-NH_2$) y grupos hidroxilos ($-OH$), los cuales poseen un par de electrones libres, que se utilizan para formar quelatos con los iones de metales divalentes. Además, el grupo amino del quitosano puede ser protonado en una solución acuosa ácida, y de esta manera se transforma en un polielectrolito catiónico. Esta propiedad se utiliza para producir la coagulación de partículas de carga negativa y moléculas de colorantes aniónicos de la industria textil¹⁴⁻¹⁷. Por esta razón se ha utilizado el quitosano en la coagulación de partículas coloidales de carga negativa de AgI. En la figura 1 se muestra la gráfica de datos experimentales de la turbidez en función de la concentración de quitosano, determinada mediante la técnica de prueba de jarras (test de jarras). De esta gráfica se deduce que la concentración óptima para producir la coagulación de las partículas suspendidas de carga negativa de AgI es 0,01 % a un pH=6.

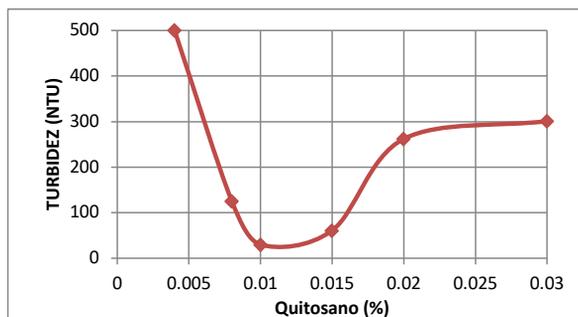


Figura 1. Turbidez del sistema coloidal de AgI en función de la concentración del quitosano.

En la figura 2 se muestra la gráfica de la turbidez del sistema coloidal de AgI, que se encontraba a un pH=6, en función de la concentración de sulfato de aluminio. De esta gráfica se deduce que la concentración óptima de sulfato de aluminio para producir la coagulación y floculación del sistema coloidal AgI es 30 ppm.

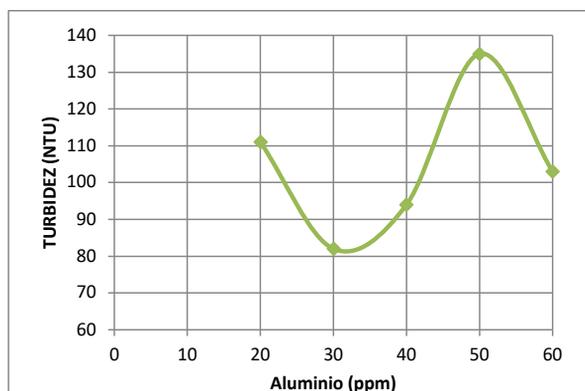


Figura 2. Turbidez del sistema coloidal de AgI en función de la concentración de Al^{3+}

Coagulación en función del volumen de quitosano y sulfato de aluminio

Una vez que se ha determinado la concentración óptima de la solución coagulante, es también muy importante determinar el volumen óptimo de esta solución que produce la coagulación de 600 mL del sistema coloidal. En las figura 3 y 4 se muestran los resultados experimentales obtenidos de la turbidez del sistema coloidal en función del volumen de la solución óptima de quitosano (0,01 %) y de la solución 30 ppm de sulfato de aluminio. En ambas gráficas se tiene dos mínimos locales, sin embargo los segundos mínimos dan un valor muy pequeño de la turbidez, que nos indica que prácticamente se han removido un 95 % de las partículas coloidales de AgI. Por consiguiente el volumen óptimo de la solución coagulante para ambos casos es aproximadamente de 25 mL.

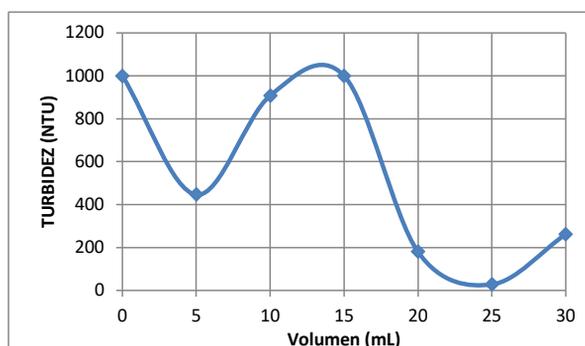


Figura 3. Turbidez del sistema coloidal de AgI en función del volumen de la solución 0,01 % de quitosano a pH=4.

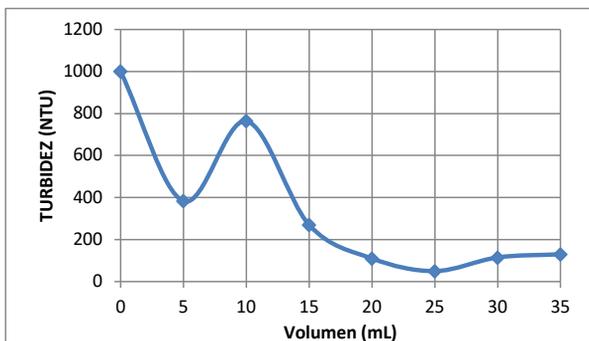


Figura 4. Turbidez del sistema coloidal AgI en función del volumen de la solución 30 ppm de sulfato de aluminio a pH =4,5

Coagulación del sistema coloidal de AgI en función del pH de la solución de quitosano y sulfato de aluminio

La molécula de quitosano tiene en sus estructura una gran cantidad de grupos hidroxilo (-OH) y grupos amino (-NH₂), los cuales tienen un par de electrones que pueden donar para formar complejos con los cationes de metales. Por esta razón en soluciones acuosas casi neutras se utiliza para remover cationes de metales pesados. A pH el grupo amino del quitosano se protona (-⁺NH₃) transformándose en un polielectrólito de carga positiva¹⁸. Esta propiedad se utiliza para producir la coagulación de colorantes catiónicos y partículas coloidales de carga positiva. En el caso de la solución de sulfato de aluminio el ion coagulante es el Al³⁺, el cual fácilmente neutraliza a la doble capa eléctrica de las partículas coloidales de AgI. Su capacidad de coagulación también depende del pH de la solución de sulfato de aluminio y del pH del sistema coloidal. Por esta razón se estudió la influencia del pH de las soluciones óptimas de quitosano (0,01 %, V=25 mL) y sulfato de aluminio (30 ppm y V=25 mL) en la coagulación de 600 mL del sistema coloidal, que se encontraba a un pH 6. Los resultados de este estudio se reportan en las gráficas de la turbidez versus el pH que se muestran en las figuras 5 y 6. De estas gráficas se deduce que el pH óptimo de la solución 0,01 % de quitosano es 4,5 y para la solución 30 ppm de sulfato de aluminio es 4, alcanzándose una remoción de partículas coloidales de 97 %.

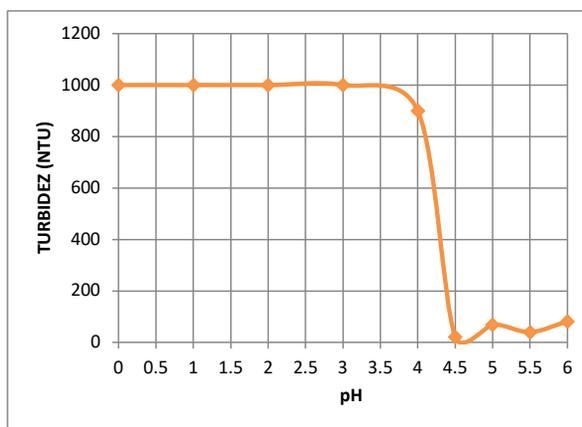


Figura 5. Efecto del pH de quitosano sobre la turbidez.

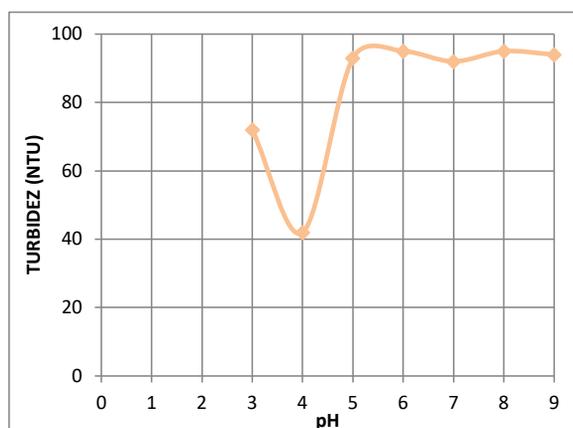


Figura 6. Efecto del pH de aluminio sobre la turbidez.

Proporción óptima del volumen de quitosano y sulfato de aluminio en la coagulación del sistema coloidal de AgI

En los pasos anteriores se han determinado los parámetros óptimos de las soluciones coagulantes de quitosano (concentración 0,01 %, volumen 25 mL y pH=4,5) y sulfato de aluminio (concentración 30 ppm, volumen 25 mL y pH=4), que producen la coagulación y floculación de 600 mL del sistema coloidal de AgI . Teniendo esta información se puede examinar la acción mixta del quitosano y sulfato de aluminio en la coagulación del sistema coloidal, los resultados de esta acción mixta se muestran en la figura 7. De la gráfica de la turbidez versus el volúmen de cada solución coagulante, que se ha agregado simultáneamente al sistema coloidal, se deduce que la proporción óptima de cada coagulante es 5 mL de sulfato de aluminio y 20 mL de quitosano. En este caso se alcanza el 98,2 % de remoción las partículas suspendidas de yoduro de plata.

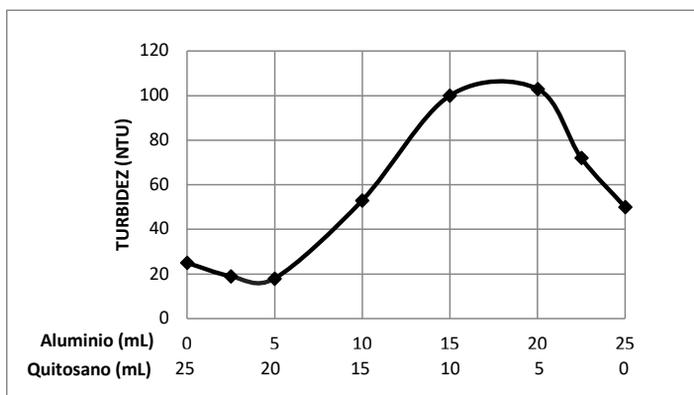


Figura 7. Turbidez del sistema coloidal en función de la proporción en volumen de Quitosano - Aluminio (Aluminio 30 ppm - Quitosano 0,01 %)

Cinética de la coagulación del sistema coloidal de AgI por la acción mixta de sulfato de aluminio y quitosano

El estudio de la cinética del proceso de coagulación y floculación permite determinar el tiempo óptimo en que se produce la separación de las partículas coloidales suspendidas por acción de los coagulantes y floculantes. En el presente caso, como la partícula coloidal tiene carga negativa, entonces el ion que produce la neutralización de la doble capa eléctrica es el Al^{3+} . Una vez que las partículas son neutralizadas, desaparece la repulsión electrostática entre ellas y, por consiguiente, se unen fácilmente para dar origen a la formación de coágulos de pequeñas dimensiones al inicio del proceso, y después estos coágulos se unen en flóculos que, por acción de la fuerza de gravedad precipitan. Para acelerar el proceso de floculación del sistema coloidal de AgI se ha utilizado el quitosano. Este biopolímero a través de grupos aminos protonados a bajo pH se une a las partículas coloidales de carga negativa y a los coágulos formados, dando lugar a la formación de flóculos muy pesados que precipitan rápidamente. De la gráfica de la turbidez en función del tiempo de coagulación - floculación, que se muestra en la figura 8, se deduce que la acción mixta del coagulante Al^{3+} y del floculante quitosano es muy rápida, pues culmina a los 3 min de haber empezado el proceso de coagulación-floculación.

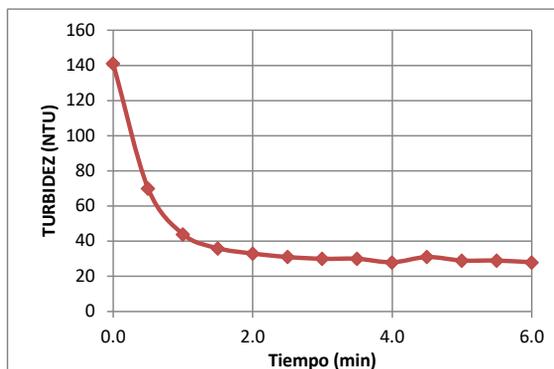


Figura 8. Curva de cinética de coagulación

CONCLUSIONES

Mediante el uso del método de Test de Jarras y turbidimetría se ha determinado que para producir la coagulación - floculación del sistema coloidal de AgI, 600 mL a pH 6, por acción de una solución de quitosano, los parámetros óptimos son: concentración 0,01 %, volumen óptimo 25 mL y pH 4,0; para el sulfato de aluminio se tiene: concentración 30 ppm, pH 4,5 y volumen 25 mL; para la acción mixta de ambos coagulantes, considerando al sulfato de aluminio como coagulate y al quitosano como floculante se tiene: volumen de quitosano 20 mL y volumen de sulfato de aluminio 5 mL, siendo la remoción de partículas coloidales del 98 %. Del estudio de la cinética de coagulación - floculación producido por ambos coagulantes en el sistema coloidal de AgI, se ha determinado que este proceso es rápido y termina a los 3 min.

AGRADECIMIENTO

Los autores reconocen y agradecen al Vicerectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM por el soporte financiero al proyecto C17071771, (2017) “Investigación de la separación selectiva de iones de metales pesados y colorantes de la industria textil de disolución acuosa por procesos de adsorción y coagulación con biopolímeros”

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romero J. Calidad del agua. México D.F.: Editorial Alfaomega; 2000.
2. Castillo J, Bracho N, Vargas L, Romeron y Aldana G. Coagulant selection for water treatment process in plant "C" Maracaibo. *Rev Téc Fac Ing Univ del Zulia*. 2000; 23(1): 169-178.
3. Franceschi M, Girou A, Carro-Diaz A, Maurette M, Pueech-Costes E. Optimisation of the coagulation-flocculation process of raw water by optimal design method. *Water Res*. 2002; 36(1): 3561-3575.
4. Lárez C. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Rev Iberoam Polím*. 2003; 4(1): 91- 109.
5. Jiang J-Q, Lloyd B. Progress in the development and use of ferrate (VI) salt as an oxidant and coagulant for water and waste water treatment. *Water Res*. 2002; 36(1): 1397-1408.
6. McLachlan DRC. Aluminium and the risk for Alzheimer's disease. *Environmetrics*. 1995; (6): 233-275.
7. Renaut F, Sancey B, Badot P, Crini G. Chitosan for coagulation/flocculation processes- An eco-friendly approach. *Eur Polym J*. 2009; 45(1): 1337-1348.
8. Fuentes L, Contreras W, Perozo R, Mendoza I, Villegas Z. Uso del quitosano de *Litopenaeus Schmitti* (Decapoda, Penaeidae) en el tratamiento de agua para consumo humano. *Multiciencias*. 2008; (8): 281-287.
9. Guibal E, Roussy J. Coagulation and flocculation of solutions containing dye using a biopolymer (Chitosan). *React Funct Polym*. 2007; 67(1): 33-42.
10. Guzman J, Saucedo I, Navarro R, Revilla J, Guibal E. Vanadium Interactions with chitosan: influence of polymer protonation and metal speciation. *Langmuir*. 2002; 18(5): 1567-173.
11. Yoshida H, Okamoto A, Yamasaki H, Kataoka T. Breakthrough curve for adsorption of acid dye on crosslinked chitosan fiber. *Stud Surf Sci Catal*. 1993; 80:767-774.
12. Chi F, Cheng W. Use de Chitosan as coagulant to treat wasterwater from milk processing plant. *J Polym Environ*. 2006; 14(2): 411-417.
13. Strand PS, Varum KM, Stgaard K. Interactions between chitosans and bacterial Suspensions: adsorption and flocculation. *Coll Surf B*. 2003; (27): 71-81.
14. Hassan M, Li T, Noor Z. Coagulation and flocculation treatment of wastewater in textile industry using chitosan. *JCEIB*. 2009; 4(1): 43-53.
15. Domar A, Rinaudo M, Terrasin C. Adsorption of chitosan and a quarternized derivate on kaolinite. *J Appl Polym Sci*. 1989; (38): 1799-1806.
16. Divakaran R, Pillai VNS. Flocculation of river silt using chitosan. *Water Res*. 2002; (36): 2412-2418.
17. Hassiba Z, Madani D, Amna S, Hakim L, Nabil M. Coagulation flocculation Test of Keddara's water dam using chitosan and sulfate Aluminium. *Procedia Eng*. 2012; (33): 254-260.
18. Zeng D, Wu J, Kennedy JF. Application of a chitosan flocculant to water treatment. *Carbohydr Polym*. 2008; (71): 135 – 139.

ESTUDIO QUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL DE LA “YARETA” *Smallanthus parviceps* (Blake) Rob

Gianella Neves Ordóñez¹, Marisol Fernández Ruiz¹, Sugia Solís Miranda¹,
Nino Castro Mandujano¹, Carlos Serrano Flores²

RESUMEN

En la presente investigación se realizó un estudio fitoquímico al aceite esencial de la “yareta” (*Smallanthus Parviceps* (Blake) Rob), recolectada en Ayacucho, en el distrito de Chumpi. Se obtuvo el aceite esencial por el método de destilación por arrastre con vapor de agua, a partir de 1,50 kg de planta fresca, su olor se puede definir como cítrico, agradable y balsámico, además el aceite esencial tiene un poder antiinflamatorio según la información etnobotánica de la planta. En cuanto a su caracterización, primero se determinó las propiedades fisicoquímicas, el cual nos indica que el aceite de “yareta” contiene 0,06 % de aceite esencial cuya densidad es 0,75g/mL y de un pH: 6, luego se determinó sus componentes por cromatografía gaseosa CG-MS. Sus componentes mayoritarios son: α -felandreno, p-cimeno, cariofileno, los isómeros α -curcumeno y β -curcumeno, α -pineno y óxido de cariofileno.

Palabras clave: yareta, alfa-felandreno, p-cimeno, cariofileno, aceite esencial.

STUDY OF THE ESSENTIAL OIL OF THE “YARETA” *Smallanthus parviceps* (Blake) Rob.

ABSTRACTS

In the present investigation, a phytochemical study was carried out on the essential oil of the “yareta” (*Smallanthus parviceps* (Blake) Rob), collected in Ayacucho in the Chumpi district. The essential oil was obtained by the distillation method by dragging with steam, from 1.50 kg of fresh plant, its smell can be defined as citric, pleasant and balsamic, in addition the essential oil has an anti-inflammatory power according to the ethnobotanical information of the plant. Regarding its characterization, the physicochemical properties were first determined, which indicates that "yareta" oil contains 0.06% of essential oil whose density is 0,75g/mL and a pH: 6, then its components were determined by CG-MS gas chromatography. Its major components are: α -felandrene, p-cymene, caryophyllene, the α -curcumene isomers and β -curcumene, to α -pymene and to caryophyllene oxide.

Key words: yareta, alfa-felandrene, p-cymene, caryophyllene, essential oil.

¹ Departamento de Química Orgánica, Escuela de Química, Facultad de Química e Ing. Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. *ocastrom@unmsm.edu.pe

² Escuela de Química, de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional San Antonio Abad de Cusco. Perú

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son líquidos oleosos volátiles obtenidos de diferentes partes de plantas, son ampliamente usados en perfumería, cosmética, en la industria farmacéutica, agricultura, como aditivos en la industria alimentaria y remedios naturales, así como en aromaterapia.¹ Las investigaciones previas han evidenciado que algunos aceites esenciales muestran algunas propiedades farmacológicas así como antiinflamatorias, antioxidante, antibacteriana, antimicótica, antimicrobiana² y otras actividades como insecticidas³.

El género *Smallanthus* fue descrito originalmente por Mackenzie en 1933, sobre la base de una sola especie norteamericana, *Smallanthus uvedalius* (L.) Mack. Posteriormente fueron transferidas a *Smallanthus* especies de otros géneros y descritas nuevas, por diferentes autores. Actualmente, el género *Smallanthus* está constituido por 24 especies, distribuidas desde el sur-este de EEUU hasta el centro-norte de Argentina, con un mayor número de especies en Perú y México⁴.

Hay varias investigaciones del género *Smallanthus*, así, Guzmán 2011, realizó estudio fitoquímico del *S. pyramidales* H Bob, quienes realizaron estudios de aislamiento de metabolitos secundarios⁵. Arnao, 2012, realizó una evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de la raíz y hojas del *Smallanthus sonchifolius* (yacón)⁶. Se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva en diferentes bases de datos (ACS Publications, Science Finder, Scopus, Scielo) y no se ha encontrado estudios fitoquímicos de la especie en estudio. Las investigaciones encontradas giran con respecto a la familia Asteraceae, realizaron la extracción del aceite esencial del *Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl, mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas.⁷ Aparicio *et al.*, 2019, realizaron la caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Libanothamnus neriiifolius* (Asteraceae), que lo obtuvieron mediante el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger⁸.

La presente investigación, tiene por finalidad realizar el estudio de la composición química y fitoquímico del aceite esencial de la yareta (*Smallanthus parviceps* (Blake) Rob), con el objetivo de evaluar una posible aplicación en el ámbito farmacéutico.

PARTE EXPERIMENTAL

Recolección de la muestra. La muestra llamada yareta, fue recolectada el 15 de julio del 2019 por la estudiante de la Escuela de Química de la UNMSM, Marisol Judith Fernández Ruiz, en el distrito de Chumpi, provincia de Parinacochas, departamento de Ayacucho; las coordenadas son: 14°41'38"S, 74°07'27" O a una altitud 3207 msnm.

La especie *Smallanthus parviceps* (Blake) Rob. es una planta oriunda del distrito de Chumpi (departamento de Ayacucho) crece cerca del agua de manantial (puquio), por lo cual lo convierten en un lugar apropiado para la evolución y adaptación de la especie vegetal. Esta

planta es aromática presenta tallos leñosos, hojas ovaladas, flores rojo-naranja en la parte superior, en las figuras 1 y 2, tenemos varias fotos de la especie en estudio. Esta planta es conocida comúnmente como yareta y los lugareños la utilizan como emplastos para inflamación de heridas y golpes.

Identificación de la muestra. La identificación botánica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por el biólogo Hamiltor Wilme Beltrán Santiago, quien nos proporcionó el nombre científico como *Smallanthus parviceps* (Blake) Rob (constancia N° 011-USM-2019). Finalmente, la muestra vegetal entera se llevó al Museo de Historia Natural de la UNMSM y su determinación taxonómica completa, la cual, toda la información está en la tabla 1.

Extracción del aceite esencial. Se observó que la planta presentaba un aroma particular, bastante similar a un fruto cítrico, por ello se realizó la extracción del aceite esencial mediante el equipo de destilación por arrastre con vapor semi industrial, ver figura 4. El procedimiento se realizó en el laboratorio de Productos Naturales de la UNMSM de la Facultad de Química e Ingeniería Química. Se agregó 8 L de agua en el reservorio inferior y en el superior de la cámara extractora, se le agregó 1500 gramos de la planta fresca, la extracción se realizó por 2 horas y se obtuvo al final 1,2 mL de aceite esencial, el cual fue guardado en un vial de color ámbar, limpio, seco y pesado; finalmente se guardó en la refrigeradora.



Figura 1. Hoja de la planta *Smallanthus parviceps* (Blake) Rob.



Figura 2. Planta *Smallanthus*.

Tabla 1. Taxonomía de la “yareta” *Smallanthus parviceps* (Blake) Rob.

CARACTERÍSTICA	CLASIFICACIÓN
Reino	Plantae
División	Magnoliopsida
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Smallantus
Especie	<i>Smallantus parviceps</i> (Blake) Rob
Nombre común	yareta

**Figura 3.** Equipo para extracción de aceites esenciales (Destilador por arrastre con vapor semi industrial)

Cromatografía de gases acoplado a masas. Este análisis se realizó en el laboratorio de cromatografía de la UNSAAC, se empleó un cromatógrafo de Agilent 6890N, con detector espectrómetro Agilent 5975B, columna Agilent HP-5MS 5 % Fenil Metil Siloxano, relación de Split 100:1, temperatura inicial de 250°C, flujo de 1 mL/min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción del aceite esencial de *S. parviceps* (Blake) Rob, fue obtenida a partir de hojas frescas mediante el equipo de destilación por arrastre con vapor semi industrial, el volumen final obtenido fue de 1,2 mL y tiene una coloración amarillo tenue. Presenta un olor que puede ser definido como cítrico, agradable y balsámico, este aroma podría ser de utilidad en industrias de fragancias y productos farmacéuticos. Su rendimiento fue de 0,06 %, calculados

sobre la base del material fresco, este valor es bajo comparado al estudio del aceite esencial de *Libanothamnus neriifolius* (Asteraceae) que fue de 0,087 %, este se realizó mediante una hidrodestilación usando una trampa tipo Clevergery, secando previamente la muestra⁷. La diferencia podría ser debido al método de extracción utilizado y al estado de la muestra, ya que según Ochoa *et al.*⁹ debería haber un mayor rendimiento usando la destilación por arrastre con vapor, si la muestra está seca. Sin embargo, por el método empleado (destilación por arrastre de vapor) se tiene mayor ventaja de producir menor hidrólisis en relación a la hidrodestilación, la presencia de agua y las altas temperaturas en el método de extracción pueden ocurrir reacciones que favorezcan en la formación de compuestos como alcoholes y ácidos por descomposición de los ésteres causando la disminución en la producción de aceite o formación de derivados. Del análisis fisicoquímico se determinó su densidad relativa 0,75 g/mL (25°C) y su pH: 6.

Composición química del aceite esencial para la especie *Smallanthus parviceps* (Blake) Rob.

La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial de las hojas de *S. parviceps* (Blake) Rob se realizó comparando los tiempos de retención y los espectros de masas con los datos reportados en la literatura. La cuantificación de los componentes principales se determinó por porcentajes de áreas.

En la tabla 2, se presentan los compuestos identificados por comparación con los índices de retención y con la librería NIST 11; se reportaron que 26 compuestos que representaban más de un 90 % de coincidencia con el espectro de la librería, también se presentan las cantidades relativas que corresponden al porcentaje de abundancia de cada componente dentro del aceite esencial. Se determinó 49 compuestos, entre ellos monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos e hidrocarburos alifáticos, los cuales constituyen cerca de 82,77 % de la composición del aceite esencial. Los monoterpenos representan el 41,87 %, donde el constituyente en mayor abundancia es el α -felandreno seguido del p-cimeno y del α -pineno.

En cuanto a los diterpenos, estos representan el 5,82 %, de los cuales el componente mayoritario es el Geranil-p-cimeno, y el Geranil-alfa-terpineno. Los sesquiterpenos encontrados representan el 35,09 %, los componentes mayoritarios encontrados son el cariofileno (sesquiterpeno bicíclico), el α -curcumeno, β -curcumeno y al final el óxido de cariofileno (sesquiterpeno bicíclico). De los hidrocarburos alifáticos, solo se identificaron 3, estos representan tan solo el 2,96 % donde el compuesto mayoritario corresponde al tricosano seguido del hexacosano (tabla 3).

Tabla 2. Composición del aceite esencial de hojas de la “yareta”.

Pico	* Compuesto Fitoquímico	Familia	*T _r (min)	% Área
1	α-pineno	M	6,10	3,66
2	4-metilen- 1-(1-metiletil)-biciclo [3.1.0] hexano	M	7,16	2,74
3	β-mirceno	M	7,65	1,03
4	α-felandreno	M	8,09	18,28
5	p-cimeno	M	8,68	8,11
6	D-Limoneno	M	8,79	0,42
7	γ-terpineno	M	9,73	0,60
8	2-metil-4-bromo-1-buteno	-	11,16	0,35
9	Terpinen-4-ol	M	13,66	0,97
10	2-metoxi-4-metil-1-(1-metiletil)-benceno	M	15,58	0,91
11	5-hidroximetilfurfural	-	16,17	0,68
12	(R)- Acetato de lavandulilo	M	17,46	1,23
13	2-acetilciclopentanona	-	18,31	1,23
14	1-butil-2-ciclohexen-1-ol	-	18,93	0,54
15	(-)-Aristoleno	S	19,15	0,40
16	Alfa-copaeno	S	20,20	0,49
17	3,5-dimetil-ciclohexanol	-	20,77	0,79
18	3-etoxi-5-metil-1H-pirazol	-	21,49	0,34
19	Cariofileno	S	21,61	8,73
20	1- metil-4-(1-metiletil)- 1,3-ciclohexadieno	-	21,79	0,74
21	Humeleno	S	22,63	1,92
22	Germacreno D	S	23,47	1,86
23	Ácido 2-bromopropiónico, éster 2-feniletílico	-	23,63	0,65
24	β-Gurjuneno	S	23,88	1,20
25	Neryl (S)-2-metilbutanoato	-	24,31	1,83
26	α-terpineno	M	24,42	0,22
27	d-Cadineno	-	24,74	1,77
28	(-)-α-Gurjuneno	-	25,15	0,37
29	Aloaromadendreno	-	25,71	0,53
30	Nerolidol	S	25,91	2,92
31	Espatuleno	S	26,34	1,32
32	Oxido de cariofileno	S	26,50	3,53
33	Epóxido de humeleno II	-	27,23	0,73
34	4-fenil-2-pirrolidinona	-	28,11	0,75
35	p-cimeno	M	34,68	0,51
36	Trans-(2-clorovinil) trimetilsilano	-	35,11	0,51
37	Geranil-α-terpineno	D	36,13	2,27
38	Geranil-p-cimeno	D	36,19	1,31
39	β-curcumeno	S	37,54	7,27
40	α-curcumeno	S	37,59	5,45
41	1,5,9,13-tetradecatetraeno	HA	38,20	0,78
42	Ácido 2-propenoico, 3-fenil-,2-feniletil éster	-	38,63	0,64
43	biciclo [3.1.1] heptano, 6-metil-2-metilen-6- (4-metil-3-pentenilo) -, [1R- (1α, 5α, 6β)]	M	39,18	0,69
44	Geranil-p-cimeno	D	39,25	0,56
45	5 H-5-Metil-6,7- dihidrociclopentapirazina	M	39,92	2,50
46	Geranil-p-cimeno	D	39,97	1,68
47	2- metilbenzil cianuro	-	41,31	1,84
48	Tricosano	HA	43,83	1,34
49	Hexacosano	HA	47,81	0,84

* Composición química del aceite esencial de hojas de *Smilanthus parviceps* (Blake) Rob * Monoterpenos (M),

Diterpenos (D), Sesquiterpenos (S), Hidrocarburos Alifáticos (HA), Tr (min): Tiempo de retención, % área:

Porcentaje relativo en el aceite esencial.

Además, se sabe que α -pineno constituye el 3,66 % del aceite esencial y el α -felanfreno el 18,28 %, el cual es muy bajo comparado con el estudio de la *Libanothamus neriifolius* (B. ex H) Ernst (Asteraceae), ya que contiene de α -pineno 13,57 % y de α -felanfreno 19,86 %⁷. Del estudio de comparación se reportaron otros compuestos mayoritarios como el β -felandreno (29,04 %) y α -tujeno (12,35 %) mientras que en nuestra investigación fueron identificados al β -curcumeno (7,11 %) y al cariofileno (8,73 %) como compuestos mayoritarios, lo cual indica la variación en la composición química de metabolitos volátiles de esta especie (Asteraceae).

Tabla 3. Clasificación de los compuestos identificados por GC-MS en el aceite esencial de la “yareta”

Clasificación	Porcentaje (%)
Monoterpenos (M)	41,87
Diterpenos (D)	5,82
Sesquiterpenos (S)	35,09
Hidrocarburos Alifáticos (HA)	2,96
Otros	14,29

La diferencia se podría atribuir a las condiciones físicas (clima, temperatura, variantes fisiológicas, etc.) que contribuyeron con la evolución de esta especie para adaptarse y sobrevivir en el medio que le rodea según Figueiredo¹⁰. Por otra parte, según la investigación realizada por Gobbo-Neto y Lopez¹¹, en las plantas medicinales existen diferentes factores que influyen en el contenido de los metabolitos secundarios: estado, temperatura, radiación UV, nutrientes del suelo, altitud, composición atmosférica, entre otros.

Sin embargo, podemos resaltar que el aceite esencial de la *S. parviceps* (Blake) Rob presenta en mayor proporción al p-cimeno (11,81 %) y al terpinen-4-ol (0,97 %) comparado con el estudio de *Wedelia calycina* L.C. Rich. (Asteraceae) que contiene de p-cimeno 0,05 % y de terpinen-4-ol 0,95 %¹². También podemos indicar que de los 49 componentes encontrados en el cromatograma, se resaltan 6 de ellos por su abundancia, tenemos al α -felandreno (Rt:8,094, A%:18,28), al o-cimeno (Rt:8,680, A%:8,11), al cariofileno (Rt:21,614, A%:8,73), a los isómeros α -curcumeno (Rt:37,588, A%:5,45) y al β -curcumeno (Rt:37,537, A%:7,27), al α -pineno (Rt:6,098, A%:3,66) y al óxido de cariofileno (Rt:7,160, A%:3,66), figura 4. De los 7 componentes abundantes podemos indicar que el α -felandreno tiene potenciales beneficios para combatir el cáncer (estudio *in vitro*) y presenta propiedades antiinflamatorias (estudio en roedores). A este compuesto se le atribuyen numerosas propiedades, dentro de las cuales tenemos, antiinflamatorias, anticonceptivas y actividad antiproliferativa según Siqueira *et al*¹².

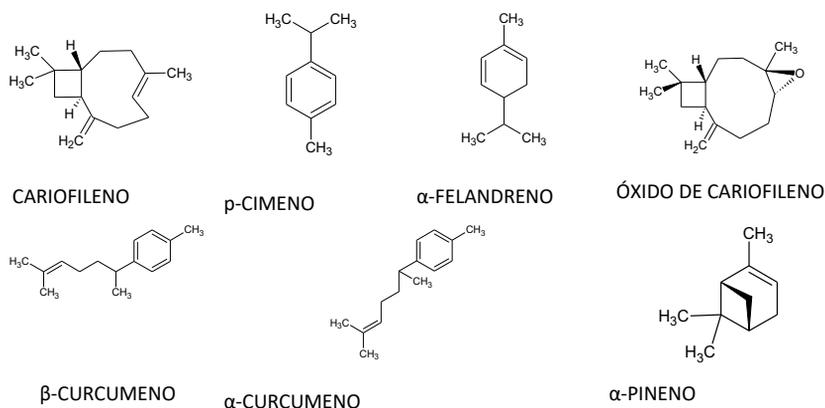


Figura 4. Estructuras de los compuestos mayoritarios del AE presentes en hojas de la planta *Smallanthus parviceps* (Blake) Rob.

En cambio, el carofileno solo tiene propiedades antiinflamatorias; por otro lado, el p-cimeno posee propiedades insecticidas y medicinales¹³ y la presencia de α -pineno en el aceite esencial, muestra un papel potencial para el tratamiento del dolor inflamatorio y neuropático¹⁴

CONCLUSIONES

De los resultados del análisis por GC-MS del aceite esencial de la planta *Smallanthus parviceps* (Blake) Rob se puede concluir que se identificaron 49 compuestos, de estos hay dos que son mayoritarios, el α -felandreno y el carofileno, los cuales son monoterpene hidrocarburo que presenta propiedades antiinflamatorias, estos compuestos pueden ser aplicados en el ámbito farmacéutico.

El presente estudio es un aporte a las investigaciones fitoquímicas de la familia Asteraceae en el Perú y en particular del género *Smallanthus*, ya que este es el primer reporte a nivel nacional en cuanto a la constitución de metabolitos volátiles de un género que cuenta con escasos estudios químicos.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al responsable del Laboratorio de Productos Naturales, la Prof. Mg. Gloria Tomas Chota, por permitirnos trabajar y hacer la extracción del aceite esencial. También un agradecimiento por los análisis fisicoquímicos y otros análisis al Dr. Julio Santiago Contreras, responsable del LIDQO (Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Química Orgánica).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li Y, Fabiano S. Essential Oils as Reagents in Green Chemistry. New York: Springer International Publishing; 2014.
2. Kahriman N, Tosun G, Terzioglu S, Karaoglu S, Yayh N. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from the Flower, Leaf, and Stem of *Senecio pandurifolius*. Rec Nat Prod. 2011; 5(2): 82 – 91
3. Leyva M, Tacoronte JE, Marquetti MC, Tiomno O, Montada D, Mesa A. Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Rev Cubana Med Trop. 2007; 60 (1): 78-82
4. Vitali M. Anatomía foliar del género *Smallanthus* (Asteraceae, Milleriacea). Bol Soc Argentina Bot. 2017; 52(3): 463-472.
5. Guzmán A, Barrera D. Estudio fitoquímico de hojas y flores de *Smallanthus pyramidales* (Triana) H. Bob (ARBOLOCO) y su uso en la recuperación de humedales de Bogotá. Colombia Forestal. 2011; 14(1), 41-50.
6. Arnao I, Suárez S, Cisneros R, Trabuco J. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de la raíz y las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón). Rev Soc Quim Perú. 2012; 78(2): 120-127.
7. Mendoza D, Parra L, Loza S. Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial y extractos etanólicos de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & endl) H. Robinson, cultivado en Colombia. Revista Biosalud. 2014; 13(2): 9-23.
8. Aparicio R, Rojas L, Velasco J, Usubillaga A, Sosa M, Rojas J. Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Libanothamnus neriiifolius* (Asteraceae). Rev Perú Biol. 2019; 26(1): 96 - 100.
9. Ochoa K, Paredes L, Bejarano D, Silva R. Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd. Scientia Agropecuaria. 2012; (3): 291-302.
10. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinales: factores influyendo en el contenido de metabolitos secundarios. Quím Nova; 2007; 30 (2): 274-381.
11. Corella R, Ortega M. Importancia del aceite esencial y la producción de orégano *Lippia palmeri* Watson en el estado de Sonora. Biotecnia. 2013; (1): 57-64.
12. Siqueira HDAS, Neto BS, Sousa DP, Gomes BS, da Silva FV, Cunha F, et al. El α -felandreno, un monoterpene cíclico, atenúa la respuesta inflamatoria mediante la inhibición de la migración de neutrófilos y la desgranulación de mastocitos. Ciencias de la vida. 2016, 160: 27-33.
13. Bruzual H, Guzmán W, Crescente O, Lanza J. Aceite esencial de *Wedelia calycina* (Asteraceae): composición química, actividad antibacteriana y antifúngica. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. 2015; (1): 87-93
14. Quintão NL, da Silva GF, Antonialli CS, Rocha LW, Cechinel FV, Ciccio JF Composición química y evaluación del efecto anti-hipernociceptivo del aceite esencial extraído de las hojas de *Ugni myricoides* en modelos inflamatorios y neuropáticos de dolor en ratones. Planta Med. 2010; 76: 1411–1418.

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE UN DIGESTOR ANAEROBIO TERMÓFILO

Edson Morales Ch^a

RESUMEN

Este estudio investiga los efectos de la reducción de tiempos de retención hidráulica, para evaluar la estabilidad de un digestor anaeróbico termófilo (55 °C), para tratar un lodo producido en una planta de tratamiento de aguas residuales de Valladolid, con una composición promedio de DQO 35,982 mg / L; SV 18,5 g / L; pH 8,08; N-NH₃ 347,5 mg / L; N-NKT 1833,8 mg / kg.

Se propuso trabajar modificando el tiempo de retención hidráulica, reduciendo progresivamente de 22,52 a 4,5 días en tres momentos por un periodo de 1001 días, aumentando la velocidad de flujo de alimentación y el aumento en los valores de la velocidad de carga orgánica. Los resultados mostraron que el reactor entró a procesos de estrés por el aumento en la carga del reactor, pero fueron tolerados y continuó generando biogás y la eliminación de SV del 37 % en promedio.

Palabras clave: digestión anaerobia, reactor termófilo, ácidos grasos volátiles

STABILITY OF A THERMOPHILIC ANAEROBIO DIGESTOR UNDER NON-COMMON OPERATING CONDITIONS

ABSTRACT

This study investigates the effects of reducing hydraulic retention times, to assess the stability of a thermophilic anaerobic digester (55° C), for treating a sludge produced in a treatment plant wastewater Valladolid, with a composition average COD 35,982 mg / L; SV 18,5 g / L; pH 8,08; N-NH₃ 347,5 mg / L; N-NKT 1833,8 mg / kg.

It was proposed to work modifying the hydraulic retention time progressively reducing from 22,52 to 4,5 days in three stages for a period of 1001 days, increasing the feed flow rate and increasing the values of the organic loading rate. The results showed that the reactor entered into stress processes due to the increase in the reactor load, but they were tolerated and continued generating biogas and the elimination of SV of 37 % on average.

Key words: anaerobic digestion, thermophilic reactor, volatile fatty acids

^a Investigador UVA, Departamento de Ingeniería Química Escuela de Ingeniería Industriales, Universidad de Valladolid, Valladolid – España. Email.: edson.morales.ch@gmail.com.

INTRODUCCIÓN

Los procesos de fabricación, transformación, utilización, consumo y/o limpieza en las actividades humanas, generan residuos sólidos, emisiones y efluentes, los cuales van a generar un impacto negativo al medio ambiente. La falta de tratamiento y el no reaprovechamiento de los residuos es un problema que cada vez toma mayor protagonismo. Asimismo, la mala disposición final de las aguas residuales urbanas en los cuerpos receptores, contienen patógenos y coliformes lo cual lo convierte en una fuente de transmisión de enfermedades infectocontagiosas¹.

En la actualidad existe una tendencia de desarrollo orientada hacia el ciclo urbano del agua para ser auto sostenible y que minimice el requerimiento de energía y la aportación de residuos al medio natural². Por ello, es importante el tratamiento de aguas residuales, ya que el agua es un recurso de gran importancia para los seres vivos y se encuentra cada vez más escasa, por lo que se debe generar conciencia para cuidarla y reusarla adecuadamente³. Es importante regresar el agua que se toma de la naturaleza, en una condición “aceptable”, para que siga su camino dentro del ciclo hidrológico⁴.

En la actualidad, las sociedades industrializadas deben asumir compromisos para el cuidado del medio ambiente, como por ejemplo la depuración de las aguas residuales; pero estos tratamientos también generan problemas ambientales como la generación de lodos, que están asociados a su tasa de crecimiento.

En la actualidad, nuestro país cuenta con una normativa para Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR), la cual regula los Límites Máximos Admisibles (LMP)⁵. De este modo, tratar los vertimientos se convierte en una necesidad para mitigar la contaminación y preservar la biodiversidad que se encuentra en los cuerpos de agua.

En España, el tratamiento de los lodos que se producen en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR), se rigen por la ley 22/2011⁶, y la normativa específica (RD 1310/1990)⁷. Para la disposición y aplicación de los lodos de depuradora en los suelos agrícolas es regulada por la Directiva 86/278/CEE⁸, la cual promueve la protección del medio ambiente, en particular de los suelos. En el Perú, los lodos de las PTAR son manejados como residuos no peligrosos, salvo en los casos que el Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento determine lo contrario⁹.

El tratamiento anaerobio por Metanogénesis es muy utilizado en la estabilización de lodos de aguas residuales y residuos sólidos urbanos¹⁰, por la facilidad del manejo y por proporcionar una fuente de energía limpia y renovable al producir biogás¹¹. Las ventajas de un reactor anaerobio son la baja producción de residuos sólidos biológicos (lodos), bajo requerimiento de nutrientes, el metano es un producto final muy útil, genera energía y es posible una carga orgánica elevada; las desventajas son el crecimiento lento de microorganismos, malos olores, requerimientos más elevados de regulador para controlar el pH y escasa eficiencia de eliminación de residuos sólidos¹⁰.

La digestión anaerobia es un proceso microbiológico muy complejo, que tiene lugar en el seno de una fase acuosa y mediante el cual la materia orgánica (MO) se transforma, principalmente, en biogás ($\text{CO}_2 + \text{CH}_4$) y nuevos microorganismos (lodo)¹². La digestión anaeróbica está conformada por cuatro etapas metabólicas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Un número diverso de bacterias participan en las tres primeras etapas y en la formación de metano (por arqueas metanogénicas) que deriva principalmente de acetato e hidrógeno (el CO_2 viene a ser un subproducto). La digestión anaerobia de lodo residual sigue siendo limitada debido a la hidrólisis, considerada el paso limitante de la velocidad de todo el proceso y con el fin de aumentar o acelerar las tasas de biodegradación, se ha probado diversos tratamientos previos como la hidrólisis térmica, enzimática, química o mecánica¹³.

En los tratamientos de doble fase (termófilo/mesófilo), la etapa de la acidogénesis termofílica ofrece beneficios operacionales, como el aumento de las tasas de hidrólisis, producción de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) y la reducción del volumen del digestor. La información de este tipo de tratamiento es limitada, de lo recopilado, la etapa acidogénica termófila se optimiza para alcanzar la tasa máxima de producción de ácido acético y regularmente como un tratamiento complementario, es conectado a un reactor anaerobio metanogénico mesófilo para terminar el tratamiento. Existe la controversia si la acidificación completa o parcial mejoraría la eficiencia del tratamiento anaerobio. Sin embargo, en los procesos de doble fase donde se acidifican completamente aguas residuales, pueden generar efectos sobre la construcción y costos operativos, debido a la necesidad de acoplar un reactor adicional para la acidificación completa de los compuestos orgánicos influentes¹⁴. La mayoría de estos estudios se han enfocado en la etapa de acidogénesis de reactores mesófilo, mientras que en los termófilos las investigaciones son muy limitadas¹⁵.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar el comportamiento en tres momentos de tratamiento M1 (1 - 418 días), M2 (419 - 641 días) y M3 (420 - 1001 días), a diferentes Tiempos de Retención Hidráulicas (TRH) y caudales en un Reactor Anaerobio Termófilo Metanogénico, todo esto para brindar un tratamiento para un lodo mixto (mezcla de lodo de un decantador primario y secundario) procedente de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de Valladolid – España.

PARTE EXPERIMENTAL

- A. Lodo a tratar:** La Universidad de Valladolid (UVA) cuenta con un convenio con la Estación Depuradora de Aguas Residuales de Valladolid (EDAR), entidad que proporcionó el lodo para la investigación, el mismo que fue colectado de la etapa de espesamiento del decantador primario y secundario, a esta mezcla se le denominó lodo mixto espesado.
- B. Reactor:** Para esta investigación se trabajó con un reactor termófilo $55\text{C}^\circ (\pm 2)$ de 50 litros de capacidad, dicho reactor ya se encontraba en funcionamiento intermitente por lo que no fue necesario inocularlo.

Los componentes del sistema de tratamiento fueron: un tanque homogenizador conectado a una bomba de regulación de caudal de alimentación, un tanque de almacenamiento de lodo tratado, un compresor para la reinyección del biogás para agitar el lodo y así mejorar la superficie de contacto, un condensador para la separación del vapor de agua del biogás, una bomba de recirculación de lodo, un equipo de pulsos para determinar la producción de biogás producido y válvulas para toma de muestras. A continuación, se muestra el esquema del reactor en la figura 1.

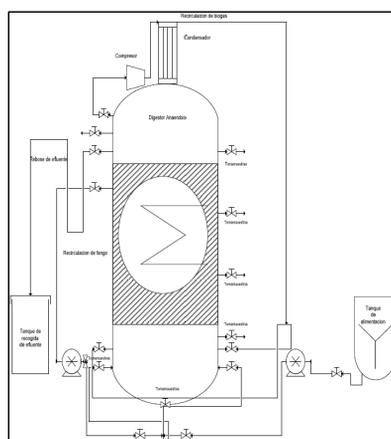


Figura 1. Esquema de un Reactor Termófilo Anaerobio

Fuente: Benito J. 2011.

- C. Monitoreo de parámetros:** Se tomaron muestras en la alimentación y salida del tratamiento, se realizaron análisis en laboratorio de parámetros como: Demanda Química de Oxígeno total (DQOt), Sólidos Totales y Volátiles (ST y SV), Amonio, Nitrógeno Kjeldahl (NKT); la Centrifugabilidad, Filtrabilidad, Tiempo de Succión Capilar (CST), Viscosidad, Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) y la Alcalinidad, todos estos parámetros antes mencionados fueron analizados tomando como referencia el Standard Methods¹⁶. Se determinó la composición con un equipo de cromatografía de gases y con un equipo de pulsos el volumen del biogás. El cálculo de los parámetros control se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Fórmulas de Parámetros de Control del Reactor Termófilo.

Parámetro	Fórmula
Carga Másica	$CM = \frac{g\ SV_{alimentación}}{gSV_{reactor} \times día}$
Tiempo de Retención Hidráulica	$TRH = \frac{Litros_{reactor}}{Caudal_{alimentación}}$
Productividad de biogás	$Productividad = \frac{ml_{biogás}}{g\ SV_{eliminada}}$
Carga volumétrica	$CV = \frac{g\ SV_{alimentación}}{Litros_{reactor} \times día}$

Fuente: Elaboración propia

- D. Estrategia de tratamiento:** Consistió en evaluar los efectos del reactor sometiéndolo a estrés, reduciendo los Tiempos de Retención Hidráulicas (TRH) en tres momentos, el primero y el segundo fue de 22,52 a 11,26 días y el tercero de 22,52 a 4,50 días. Al someter a estrés al reactor se evaluó los cambios en los parámetros monitoreados, analizados en laboratorio y descritos en el acápite “C”.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

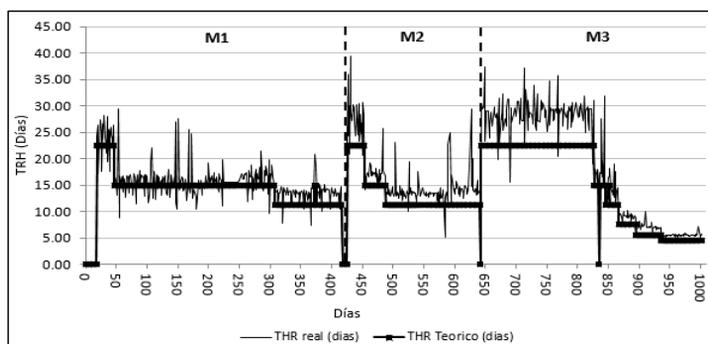
Algunos estudios se centran en la influencia del TRH en la sedimentabilidad de los fangos entre otros parámetros también de interés, evaluando fases anaerobias en seis ensayos con diferentes TRH y distintos tiempos de reacción anaerobia⁷. En esta investigación se evaluó el desempeño del reactor, fue afectado cada vez que se reducía el Tiempo de Retención Hidráulica (TRH), el criterio que se tomó para la disminución fue la estabilidad en los parámetros, como la concentración de amonio, productividad de biogás, % eliminación de DQO, ST y SV. Las condiciones operacionales de alimentación promedio en función del TRH en los tres momentos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Evolución de los parámetros de alimentación a diferente TRH.

Días	Mto.	DQO (mg/L)	pH	ST (g/L)	SV (g/L)	Parámetros			CM (gSV/gSV·d)
						NH ₃ ⁺ (mg/L)	NKT (mg/Kg)	CV (gSV/L·d)	
22,5	M1	53339	8,24	47,0	26,8	829,9	2343,2	0,66	0,01
	M2	33186	8,13	14,2	10,9	328,2	1421,7	0,40	0,01
	M3	33733	8,18	26,1	17,4	432,7	1817,3	0,62	0,01
15,03	M1	42535	8,15	27,2	18,1	406,8	1990,2	1,17	0,03
	M2	34436	7,83	25,4	19,7	325,4	1395,4	1,12	0,03
	M3	27594	8,10	24,2	18,7	314,0	2012,4	0,95	0,02
11,26	M1	34097	8,09	25,2	16,1	259,2	1511,9	1,19	0,02
	M2	32453	8,13	24,9	17,9	306,1	1734,1	1,24	0,03
	M3	26863	7,96	26,6	21,0	218,8	1729,5	1,46	0,03
7,5	M3	29433	7,88	24,4	18,9	190,5	1763,7	2,09	0,04
5,6	M3	30692	7,90	32,5	23,7	204,0	2046,8	3,29	0,06
4,5	M3	31386	7,92	33,5	21,8	234,5	1757,0	3,86	0,07

Fuente: Elaboración propia

En la figura 2 se presenta el TRH, el cual se modificó por el aumento del caudal de alimentación en cada momento. Se trabajó con dos tipos de TRH, el real y el teórico (programación de la bomba de alimentación), si bien se observa que los valores reales frente a los teóricos fueron mayores, ambos describen un comportamiento muy similar. También se observa que existe mayor variabilidad en los TRH reales, esto se debió a la consistencia del lodo.

**Figura 2.** Evolución del Tiempo de Retención Hidráulica

Fuente: Elaboración propia.

En general, a mayor concentración de sólidos volátiles a la entrada, mayor concentración de sólidos a la salida. Sin embargo, a pesar de tener una concentración menor de sólidos volátiles, la eliminación es mayor². De acuerdo a la figura 3, los datos experimentales obtenidos de los Sólidos Volátiles (SV) de la entrada y la salida fueron variables, esto influyó al TRH real (la bomba de alimentación suministraba diferentes concentraciones de SV al reactor). Se observa ciertos días donde los valores de SV entrada son menores a los de la salida, esto se debe a que el lodo tenía menos consistencia ciertas semanas que otras.

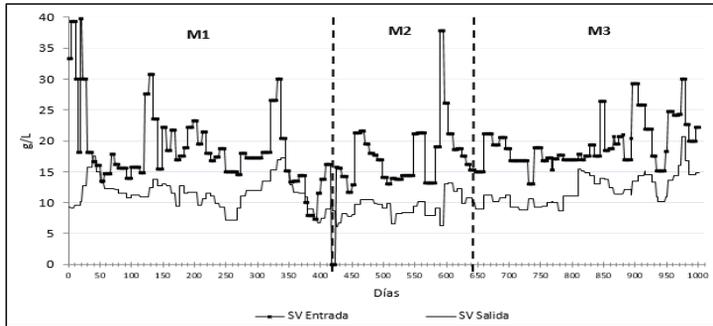


Figura 3. Evolución de los Sólidos Volátiles a la entrada y salida del tratamiento.
Fuente: Elaboración propia.

A 6 días de TRH y menor carga orgánica en su etapa VI, se observó una disminución sobre la eficiencia de eliminación de DQO (40,6%)¹⁸. En esta investigación, en la figura 4, se muestra el comportamiento del % de eliminación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO), por cada momento, se observa que fue muy variable, esto se debería por la concentración de los SV que tiene un comportamiento similar y la disminución del TRH, pero logra estabilizarse e incrementar el % de eliminación de la DQO, que en promedio fue de 42 %. Los valores de la DQO de entrada y salida también describen un comportamiento irregular teniendo un valor promedio de 35982 y 19496 mg/L, respectivamente.

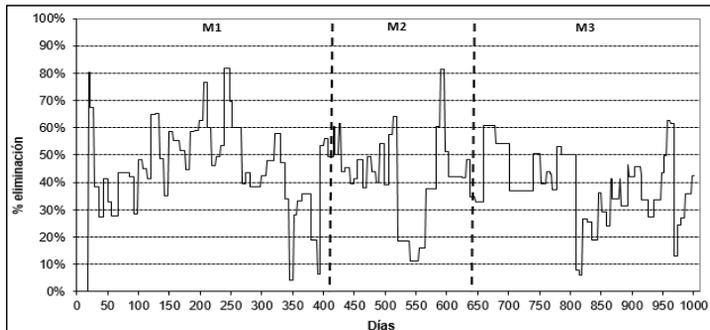


Figura 4. Porcentaje de eliminación de la DQO.
Fuente: Elaboración propia.

La mayor acumulación de AGVs, genera inestabilidad en el reactor, por posibles problemas de acidificación si no se controla adecuadamente. Por esta razón es necesario un control minucioso de los caudales de fases, para evitar este tipo de problemas². La evolución de los Ácidos Grasos Volátiles (AGVs), se evaluaron con dos métodos, el primero con un equipo de

cromatografía el cual generaba valores más exactos, pero demoraban 5 días, el otro método fue por valoración siendo el menos exacto pero el más inmediato (una hora), en la figura 5 se puede observar que los valores fueron muy cercanos y de comportamiento similar. Al inicio del momento “M1” el reactor estaba en proceso de adecuación, por ello existía una mayor diferencia entre los métodos de análisis.

En el momento “M3”, en el día 965 aproximadamente, se observa un incremento en la concentración de los ácidos grasos, esto se debió al aumento del caudal y por llevar al reactor a un punto de estrés, pero luego de unos días se estabiliza y tolera estos cambios.

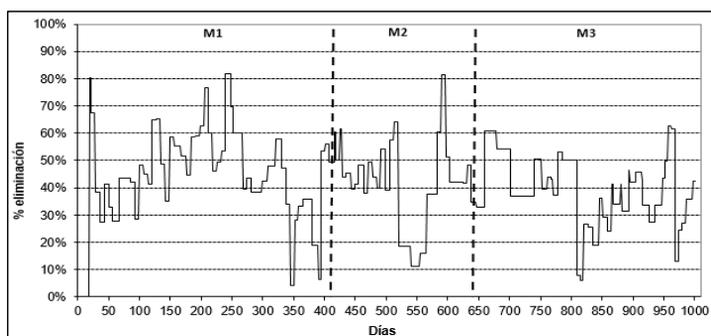


Figura 5. Concentración del AGV del método de valoración y cromatografía.
Fuente: Elaboración propia.

A medida que pasa el tiempo aumenta la concentración de sólidos en el reactor, aunque la concentración de sólidos en la alimentación sea mayor, el reactor amortigua esa concentración, y la carga másica resulta ser menor que en las primeras etapas de tratamientos². En esta investigación se muestra, en la figura 6, el comportamiento que describió los valores de la productividad de biogás, con la Carga Másica (CM) fue inversamente proporcional. Se observa valores picos de la productividad, esto se debió a problemas con la alimentación (obstrucciones) se puede tomar como datos “outlier”. Además, en la producción de biogás el porcentaje promedio de metano en “M1; M2 y M3” fue 62,4031; 61,2108 y 62,1083 %, respectivamente. La CM tuvo un comportamiento irregular que se debió principalmente a la concentración variable de sólidos en el lodo. En el momento 3 se observa el incremento de la carga másica, esto se debe al aumento del caudal o reducción del TRH, pero la productividad de biogás se mantuvo.

En su etapa VI se observó un incremento en la producción de biogás predominando el CH₄ en un 68,2 % y disminuyendo el CO₂ (31,8 %), al favorecerse el desarrollo de las condiciones metanogénicas (pH > 7,1), debido al aumento del TRH₁₀. Muy similar al de esta investigación.

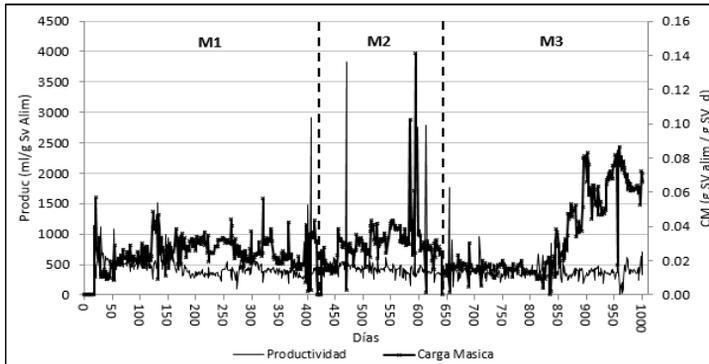


Figura 6. Productividad vs Carga Máfica.
Fuente: Elaboración propia.

Carga Máfica (CM) y el % eliminación de SV tienen un comportamiento similar a diferencia del “M3”, donde el % de eliminación disminuye, esto es un indicativo de que el reactor está siendo sometido a estrés (figura 7).

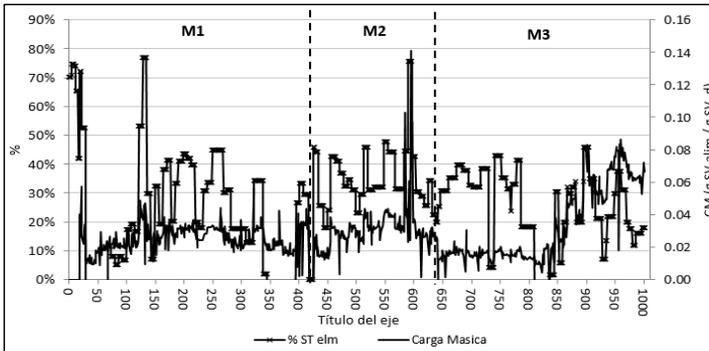


Figura 7. % Eliminación SV vs Carga Máfica.
Fuente: Elaboración propia.

Los g SV alimentados que se convirtieron a ml de biogás (productividad) y la cantidad de biogás que se generó tuvo un comportamiento ascendente debido al incremento de la CM. En la generación de metano en “M1, M2 y M3” en promedio fueron 30, 27 y 40 L/d, respectivamente, en el momento “M3” se observa un incremento porque las bacterias tenían más concentrado, por ende mayor biogás.

Se realizaron en el momento 3 pruebas complementarias como CST, Deshidratabilidad, Filtrabilidad y Viscosidad, en laboratorio a la entrada y salida del reactor en el 879 y 915 días, en los cuales sufrieron una disminución del TRH teórico de 7,5 a 5,6 días.

Para medir la filtrabilidad se realizó con la prueba del Tiempo de Succión Capilar (CST), utilizó la presión de succión capilar en un papel poroso en el tiempo, filtrado con el avance entre los electrodos separados radialmente. La velocidad del filtrado pasa por un medio filtrante y es controlada por la filtrabilidad de la suspensión, de tal modo que a menor valor de CST, la filtrabilidad de un lodo será mejor. La filtrabilidad no es afectada significativamente por la disminución del TRH teórico de 7,5 a 5,6 días.

La separación en una fase sólida y líquida del lodo se realiza por el método de la centrifugación, se da por la sedimentación del sólido con partículas de mayor densidad. La centrifugabilidad en los días 879 y 915 en la alimentación como la salida son muy similares para el % de recuperación de la torta y la concentración de sólidos en la torta.

La viscosidad se define como la medida de la fricción interna de un fluido en relación con otro. En los días 879 y 915 se analizó la viscosidad del lodo en la entrada (0,2529 y 0,2525) y salida (0,1786 y 0,1812) centi poise (cP), respectivamente, en ambos casos después del tratamiento, la viscosidad descendió.

CONCLUSIONES

- Por más que se incrementó el caudal en los tres momentos de evaluación, el reactor metanogénico no llegó a transformarse en un acidogénico, porque continuó produciendo biogás con un porcentaje de promedio de metano de 62,0825 % y la eliminación de la DQO en promedio fue de 42 %.
- En los momentos del tratamiento y en particular en el “M3”, se observa incremento de la carga másica por el incremento del caudal o reducción del TRH, pero manteniéndose la productividad de biogás.
- En los tres momentos sujetos a variaciones en los TRH, el reactor demostró ser estable al asimilar los cambios en la composición y características del lodo de alimentación.
- Durante el tratamiento anaerobio termófilo la centrifugabilidad y filtrabilidad del lodo no varía significativamente.
- No se detectaron problemas de inhibición de ácidos grasos porque en los tres momentos del tratamiento los resultados de los AGVs no superaron los 2181 mg AcOH/L.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que colaboraron con el desarrollo de este trabajo de investigación, en particular a mi hermana Diana Morales, mi padre Javier Morales, a mi madre Norma Chuquimantari, hermanita Nataly Morales, a mi asesor Fernando Fernández Polanco y a un gran amigo Jaime Benito, quienes hicieron posible cumplir este objetivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Crisanto C. Evaluación de estiércol de equino y aguas residuales domésticas para la producción de biogás y biol mediante digestores semi continuos. [Tesis de pregrado]. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2016.
2. Benito J. Variación de las condiciones operacionales habituales de los digestores anaerobios de lodos: Digestión Anaerobia Termófila. [Tesis de Master]. Valladolid -España: Universidad de Valladolid; 2011.
3. Delgado R. Tratamiento de efluentes de un reactor uasb mediante una mezcla de amonio cuaternario y hierro. [Tesis de pregrado]. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú; 2018.
4. Lahera V. Infraestructura Sustentable: Las plantas de tratamiento de aguas residuales. Madrid, España: Universidad Autónoma; 2010.
5. MINAM. D.S N° 003-2010 MINAM, Límites Máximos Permisibles para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales. El Peruano. 2010 Mar 10: 415675-415676.
6. Ley 22/2011 de Residuos y Suelos Contaminados, España. BOE [Internet]. 2011 [accesado 18 jul 2019]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2011/BOE-A-2011-13046-consolidado.pdf>
7. Real Decreto 1310/1990, Utilización de lodos de depuración en el sector agrario, 1990. España. BOE [Internet]. 1990; 262: 32339-32340 [accesado 17 jul 2019]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/1990/11/01/pdfs/A32339-32340.pdf>
8. Directiva 86/278/CEE, Protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura. Comunidad Económica Europea. Diario Oficial de las Comunidades Europeas [Internet]. 1986; 4. 7. 86: N° L 181/6-L 181/12 [accesado 17 jun 2019]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:31986L0278&from=ES>
9. DL N° 1278 MINAM, Ley De Gestión Integral de Residuos Sólidos, Perú. [Internet]. 2017 [Accesado 02 nov 2019]. Disponible en: <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/04/Decreto-Legislativo-N%C2%B0-1278.pdf>
10. McCarty P, Rittmann B. Biotecnología del Medio Ambiente. México DF: Editorial Mc Graw Hill; 2001.
11. Sáez J. Diseño de un reactor anaerobio para la digestión de fangos. [Tesis de grado de Ingeniero] Valencia: Universidad de Valencia – España; 2017. [Accesado el 01 agosto del 2019]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/100168/S%C3%81EZ%20-%20Dise%C3%B1o%20de%20un%20reactor%20anaerobio%20para%20la%20digesti%C3%B3n%20de%20fangos.pdf?sequence=1>
12. Mendes L. Estudio de un sistema híbrido uasb+mbr para el tratamiento de aguas residuales urbanas [Tesis de Maestría]. Alicante: Universidad de Alicante, España; 2015 [Accesado el 15 de julio 2019] Disponible en: <https://iuaca.ua.es/es/master-agua/documentos/-gestadm/trabajos-fin-de-master/tfm09/tfm09-lyvia-mendes-predolin.pdf>
13. Gagliano MC, Braguglia CM, Gallipoli A, Gianico A, Rossetti S. Microbial diversity in innovative mesophilic/thermophilic temperature-phased anaerobic digestion of sludge. Environ Sci Pollut Res Int. 2015;22(10):7339-7348.

14. Kim W, Shin SG, Cho K, Lee C, Hwang S. Performance of methanogenic reactors in temperature phased two-stage anaerobic digestion of swine wastewater. *J Biosci Bioeng.* 2012;114(6):635-639.
15. Yu H-Q, Fang H, Gu G-W, Comparative performance of mesophilic and thermophilic acidogenic upflow reactors. *Process Biochem.* 2002; 38: 447-454.
16. Standard Methods APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington, DC, EEUU: American Public Health Association; 2005.
17. Muda K, Aris A, Salim M, Ibrahim Z, van Loosdrecht M, Ahmad A, et al. The effect of hydraulic retention time on granular sludge biomass in treating textile wastewater. *Water Res.* 2010; 45(16): 4711-472.1
18. Terreros-Mecalco J, Olmos-Dichara A, Noyola-Robles A, Ramírez-Vives F y Monroy-Hermosillo O. Digestión anaerobia de lodo primario y secundario en dos reactores UASB en serie. *Rev Mex Ing Quím.* 2009; 8(2): 153-161.

EVALUACIÓN DEL NIVEL CONTAMINANTE DE OCRATOXINA A (OTA) MEDIANTE COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA EN *Coffea arabica* L. “CAFÉ”

Félix Hugo Milla Flores^{*a}, Américo Castro Luna^a.

RESUMEN

El estudio tiene como objetivo evaluar el nivel contaminante de la ocratoxina A (OTA) en *Coffea arabica* L. “café”, de tipo tostado, purificado mediante columnas de inmunoafinidad y cuantificado por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). La OTA es una micotoxina nefrotóxica-cancerígena capaz de causar efectos adversos sobre la salud humana y animal. Se encuentra en muchos alimentos procesados y no procesados, entre ellos el café, que es un alimento de elevado consumo. La recolección de muestras de café tostado se realizó en la zona cafetalera de Chanchamayo, departamento de Junín-Perú. La separación y purificación de la ocratoxina A se realizó en columnas de inmunoafinidad NeoColumn, posteriormente su cuantificación se realizó por HPLC con detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 333 nm y longitud de onda de emisión de 460 nm. Finalmente, se realizaron pruebas de recuperación a un nivel contaminante de 5 ppb. Los resultados obtenidos en las muestras de café tostado presentan un contenido de 0,216 y 0,444 ppb de OTA los cuales no superan los límites permitidos por la legislación internacional. El porcentaje de recuperación al nivel de 5 ppb fue de 76,231 %. El estudio remarca la importancia de la trazabilidad en un producto de consumo frecuente a nivel nacional e internacional con la finalidad de garantizar su inocuidad.

Palabras clave: Micotoxina, ocratoxina A, café tostado, columna de inmunoafinidad, cromatografía líquida de alta afinidad.

a Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Jr Puno 1002. Lima- Perú.
fmillaf@gmail.com

EVALUATION OF THE POLLUTANT LEVEL OF OCHRATOXIN A (OTA) THROUGH IMMUNOAFFINITY COLUMNS AND HIGH EFFICIENCY LIQUID CHROMATOGRAPHY IN *Coffea arabica* L. "COFFEE"

ABSTRACT

The study aims to evaluate the contaminant level of Ochratoxin A (OTA) in *Coffea arabica* L. "coffee", roasted, purified by immunoaffinity columns and quantified by High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC). OTA is a nephrotoxic-carcinogenic mycotoxin capable of causing adverse effects on human and animal health. It is found in many processed and unprocessed foods, including coffee, which is a food with high consumption. Roasted coffee samples were collected in the coffee zone of Chanchamayo, department of Junin-Peru. The separation and purification of the Ochratoxin A was performed by NeoColumn immunoaffinity columns, subsequently quantification was performed by HPLC with fluorescence detector, at an excitation wavelength of 333 nm and emission wavelength of 460 nm. Finally, the test of percent of recovery were carried out at the contaminant level of 5 ppb. The results obtained in roasted coffee samples have a content of 0,216 and 0,444 ppb of OTA which do not exceed the limits allowed by international law. The recovery rate at level 5 ppb was 76,231 %. The study highlights the importance of traceability in a product of frequent consumption at national and international level, in order to ensure its safety.

Key words: Mycotoxin, ochratoxin A, roasted coffee, immunoaffinity column, high affinity liquid chromatography.

INTRODUCCIÓN

La ocratoxina A es comúnmente producida por los mohos *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium viridicatum*; su presencia está asociada a los productos como el maíz, la cebada, el café verde y varias frutas secas¹. La ocratoxina A puede estar presente en conjunción con las aflatoxinas, sustancias consideradas como carcinógenos naturales. La ocratoxina A es un potencial agente carcinógeno, que afecta los riñones de los animales expuestos a dicha micotoxina².

Se estima que una cuarta parte de las cosechas mundiales están contaminadas por micotoxinas. Un estudio analizó 2 753 muestras de cereales y piensos, revelando que más de la mitad de las muestras de origen europeo y la tercera parte de la región Asia – Pacífico estaban contaminadas con niveles de micotoxinas por encima del límite de cuantificación³.

El consumo mundial de café supera los seis millones de toneladas al año y la venta minorista, principalmente en Europa, EE.UU. y el Japón, se encuentra alrededor de los 70 000 millones de dólares al año. Los países en desarrollo que producen la materia prima reciben unos 6 000 millones de dólares⁴.

Aunque no hay un nivel consultivo o regulatorio para la ocratoxina A emitido por la Administración de Alimentos de los EE.UU., muchos coinciden que los niveles entre 10-20 partes por mil millones (ppb) en productos destinados al consumo humano o animal pueden causar problemas de salud y pérdidas económicas. Algunos mercados extranjeros han establecido límites de regulación que van desde 5-50 ppb para el comercio interno, mientras que la Comisión Europea desde el año 2006 ha establecido un límite máximo de 5 ppb para café tostado⁵.

La mejor protección contra las micotoxinas es controlar su presencia en piensos y alimentos. Eso significa mantener un control en todo el camino productivo desde la cosecha inicial de granos hasta el producto terminado.

PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se realizó en el Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y en el Laboratorio de Investigación y Certificaciones (LABICER) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

Reactivos

Acetonitrilo de grado HPLC de la marca J.T Baker, estándar de ocratoxina A (OTA) 99,18 %, metanol grado HPLC (Merck), ácido acético (CH_3COOH) grado analítico 100 %, Buffer fosfato salino en tabletas pH=7,40 (PBS) y Tween 20 adquiridos de la casa comercial Merck. El agua utilizada fue purificada en un equipo Elga Purelab CLASSIC UV.

Equipos

Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento-SHIMADZU que posee: desgasificador DGU-20A5R, automuestreador SIL-30AC, bomba cuaternaria LC-30AD, horno de columna: CTO-20AC, detector de fluorescencia RF-20Axs, control de sistema CBM-20A; Columna cromatográfica RP C18 de 250 mm x 4,6 mm ID x 5 μm partícula (Restek); Molinillo Bosch, agitadores magnéticos de las marcas Thermo Scientific Cimarec e IKA C-MAG HS7; Balanza analítica digital GR-300 AND, equipo ultrasonido WISD Laboratory Instruments; Ultrapurificador de agua ELGA PURELAB CLASSIC UV y columnas de inmunoafinidad para ocratoxina NEOCOLUMN.

Colecta de la muestra

Los granos de café tostado provinieron del departamento de Junín, provincia de Chanchamayo, distrito Perené del anexo Pampa Tigre. Las actividades de muestreo se realizaron a temperatura ambiente y humedad atmosférica característica de la zona en el mes de noviembre de 2018. Las muestras fueron rotuladas y transportadas al departamento de Lima para su tratamiento y respectivos análisis.

Tratamiento de la muestra

Los granos de café fueron secados en una estufa a 38°C por 24 horas. Las muestras de café tostado se molieron en un molinillo Bosch. Una vez trituradas se homogenizaron y se conservaron a temperatura de refrigeración en el rango de 0°C a 4°C para su posterior análisis.

Preparación de los estándares de ocratoxina A

La solución principal del estándar de OTA se preparó diluyendo 1 mg de estándar OTA en 50 mL de mMetanol, teniendo una concentración de 20 ppm. A partir de la solución principal, se preparó la solución de trabajo a una concentración de 200 ppb y a partir de esta solución se prepararon los diferentes estándares utilizados para la construcción de la curva de calibración, cuyas concentraciones variaron de 0,05 a 10 ppb. De la solución madre se prepararon las soluciones utilizadas en las pruebas de recuperación del método utilizado en granos tostados.

Extracción y purificación de la ocratoxina A en las muestras

Se utilizó 10 g de café tostado finamente molido, y pasado por un tamiz de 0,5 mm. Para las extracciones se utilizó 100 ml de metanol con bicarbonato en una proporción de 7:3 de metanol y solución de bicarbonato de sodio al 1 %, respectivamente. Luego, se mezcló en un agitador magnético a alta velocidad durante tres minutos, se dejó en reposo por tres minutos y se filtró el sobrenadante líquido con un papel Whatman N°426-7.

Se mide cinco mililitros del filtrado y se diluye con 45 ml de PBS / Tween (0,01% v / v) obteniendo un volumen final de 50 ml. Con una de jeringa de 50 ml y un adaptador de columna, se eluyó la muestra de 50 ml a través de la columna de inmunoafinidad gota a gota. Se tomó en consideración que la columna no se seque. Posteriormente, se lavó la columna con 20 ml de PBS / Tween (0,01% v / v) y con 10 ml de PBS, manteniendo las mismas consideraciones. Se aseguró en eliminar todo el líquido de la columna utilizando presión positiva de una jeringa⁸. La OTA se reconstituyó con 0,75 mL de metanol acidificado; 0,75 mL de metanol y 1,5 de agua ultrapura, según las indicaciones del fabricante de Columnas de Inmunoafinidad Neocolumn.

Cuantificación por cromatografía líquida de alto rendimiento

Los análisis se realizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento con detección por fluorescencia, la metodología y las condiciones del equipo propuestas por Tafuri⁹.

La longitud de onda de excitación fue de 333 nm y la longitud de onda de emisión fue de 460 nm. La temperatura del horno de la columna fue de 25 °C. La elución fue a un flujo constante de 1 mL/min de CH₃CN (ácido acético 1%) y H₂O (ácido acético 1 %) (50:50 v/v) como el sistema inicial de eluyentes. La gradiente de elución, se inició con el acondicionamiento del sistema de solventes por 20 min desde 50 % hasta 100 % de CH₃CN la cual se mantuvo durante 3 minutos; los últimos 10 minutos el sistema se restableció a sus condiciones iniciales de CH₃CN 50 % y H₂O 50 %.

Los eluyentes y las muestras fueron filtrados a través de filtro de jeringa (0,22 μm), el volumen de inyección a la columna cromatográfica fue de 25 μL .

Las lecturas de los estándares de OTA y muestras problemas se realizaron por duplicado. La identificación de OTA se realizó utilizando el tiempo promedio de retención de las diluciones de los estándares. Este tiempo de retención y Límite de Detección (LDD) se determinó midiendo diez veces el estándar de trabajo a una concentración de 0,09918 ppb, El tiempo de retención promedio fue de $7,964 \pm 0,010$ minutos y el LDD promedio fue de $0,019 \pm 0,001$ ppb.

Pruebas de recuperación del método utilizado

Para determinar la eficacia en el proceso de recuperado se procedió elaborando un blanco para la muestra de granos de café tostado, adicionado a una concentración de 5 ppb con estándar de OTA. Las muestras adicionadas se trataron de igual manera que las muestras problemas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación de la ocratoxina A se realizó utilizando el tiempo de retención promedio de las diluciones de trabajo, el cual fue de 7,964 min, a partir del estándar de menor concentración (0,09918 $\mu\text{g/L}$) se realizaron 10 repeticiones.

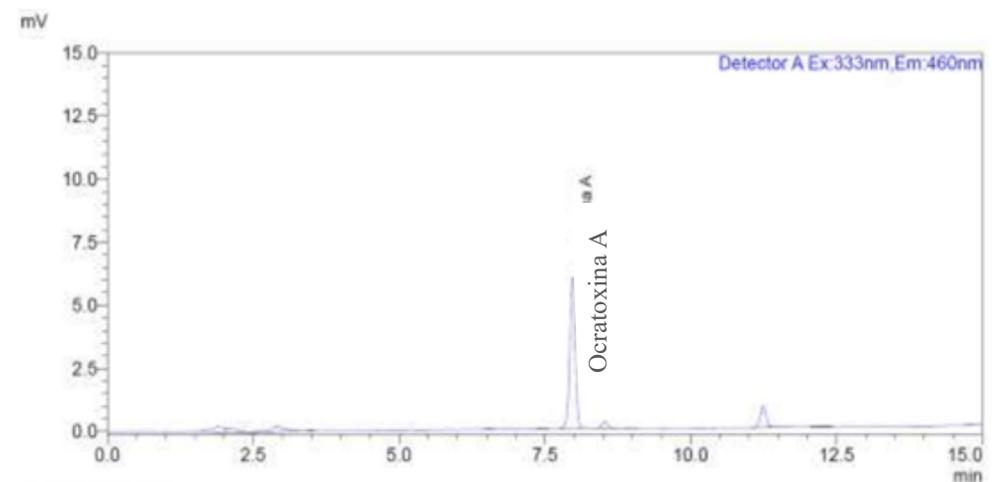


Figura 1. Cromatograma del estándar de ocratoxina A a concentración de 9,632.

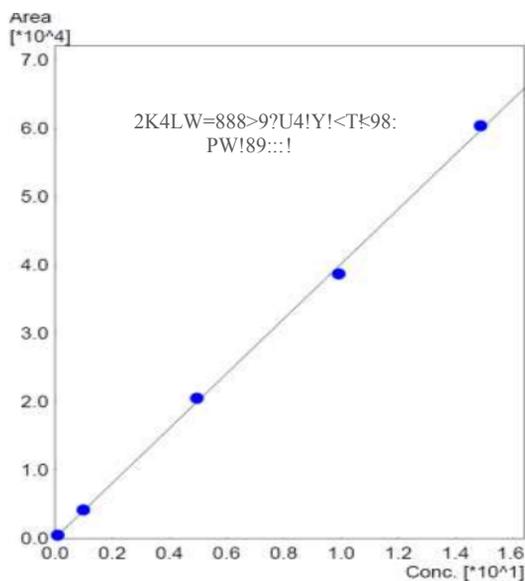


Figura 2. Curva de calibración utilizada para la cuantificación de ocratoxina A a concentraciones promedio de 0,099; 0,991; 4,959; 9,918; 14,877 $\mu\text{g/L}$.

El método de recuperación utilizado para el análisis de OTA fue evaluado al nivel de 5 ppb (a) de OTA, los resultados se muestran en la tabla 1.⁵

Tabla 1. Contenido de OTA en las muestras adicionadas de café tostado.

Muestra	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración	%RSD*
Café tostado	7,982	2697	416	0,643 $\mu\text{g/L}$	
Muestra adicionada con OTA	7,981	2634	415	0,627 $\mu\text{g/L}$	1,760

*RSD= desviación estandar relativa. El porcentaje de recuperación fue de 76,231 % evaluado al nivel de 5 ppb.

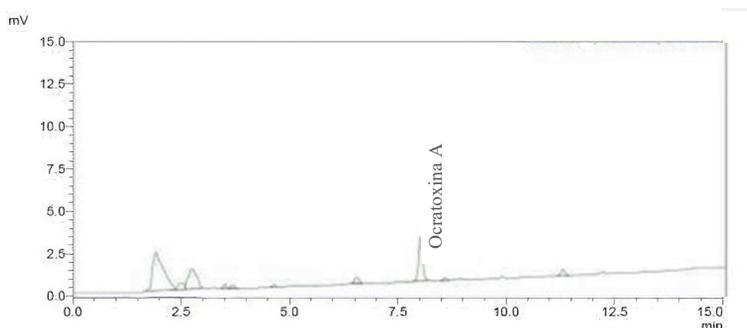


Figura 3. Cromatograma de la prueba de recuperación de la muestra con adición de 5 ppb de OTA.

El propósito de la extracción es fijar la ocratoxina A en la matriz de análisis, es decir sobre el material de la columna de inmunoafinidad, usando solventes adecuados para su posterior recuperación y cuantificación. Los solventes de extracción y el método utilizado son las dos consideraciones más importantes para el procedimiento de extracción de ocratoxina A¹⁰. La selección del solvente de extracción depende de varios factores, incluidas las características físicas y químicas del analito, el costo y la seguridad del solvente, la solubilidad de compuestos diferentes a la ocratoxina A (interferencia por colorantes u otros componentes) y los procesos después de la extracción¹¹.

En la investigación se utilizó columnas de inmunoafinidad para ocratoxina A de la marca NeoColumn código del producto 8640, fabricadas por NeoGen® Corporation, el cual posee un método de extracción validado para muestras de café verde, tostado e instantáneo, aunque existe diversos variantes de los sistemas de solventes de extracción de OTA en café⁹⁻¹².

Se recomienda el uso de una disolución de metanol al 60 % y agua al 40 %¹². También, se han utilizado como solvente de extracción metanol y solución de bicarbonato de sodio al 3 % en la relación 1:1¹³. Al saber que la OTA es una molécula de polaridad media, se busca el uso de solventes polares y semipolares, esto es contrastable en diversas investigaciones, aunque suelen existir modificaciones para permitir mayores eficiencias en la extracción relacionadas a menos efectos de interferencia. Existen reportes utilizando solventes como la acetona, acetato de etilo, cloroformo para la extracción de ocratoxina A en matrices complejas¹⁴⁻¹⁶, cabe acotar que el uso de solventes apolares como en acetato de etilo para la extracción de OTA, puede ser necesario bajo un procedimiento de desengrase adicional antes de la detección o purificación, adicionalmente del uso de solventes semipolares acidificados para su reconocimiento por HPLC¹⁴.

Las muestras adicionadas con OTA presentaron un porcentaje de recuperación de 76,23% al nivel de 5 ppb. Los límites de recuperación comúnmente aceptados para un nivel de contaminación de OTA de 10 ppb están comprendidos entre 70 a 125 % de recuperación¹⁷.

Para la concentración evaluada a 5 ppb de OTA, el porcentaje de recuperación del método de la Comunidad Europea⁵, se encontró entre estos los límites. Sin embargo, existen métodos en donde el porcentaje de recuperación para concentraciones más bajas de OTA (5 ppb) fue inferior al 70 % con el método validado por la Unión Europea (UE) “14132”¹⁵. La recuperación por el método de Pittet¹⁸, el cual emplea solventes como metanol y bicarbonato de sodio al 3 %, difiere del método usado en los volúmenes de extracción y soluciones estabilizadas de lavado (PBS pH 7,4).

Las condiciones de los solventes que presenten un pH demasiado alto conducen a la formación de OTA de anillo abierto (OP-OA), que no es reconocido por los anticuerpos OTA en el procedimiento de purificación o limpieza. Estas circunstancias ya han sido reportadas durante el análisis de otras matrices contaminadas con OTA^{19,20}.

La dilución realizada en nuestro método y el uso de PBS ajustado a 7,4 de pH, permite que se realice la conversión de OP-OTA en OTA antes del proceso de purificación por columnas de inmunoafinidad. Los valores de recuperación son relativamente constantes con un promedio del 70 %. Se recomienda que las recuperaciones inferiores al 60 % pueden estar sujetas a investigaciones que conduzcan a una mejora en los métodos y solventes de extracción¹⁷. Manteniendo la línea de investigación en la búsqueda de eficacia de los métodos de recuperación.

Los resultados obtenidos de OTA en muestras de granos de café tostado se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Contenido de OTA en las muestras de café tostado.

Muestra	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración	%RSD
Café tostado	8,077	407	37	0,071 µg/L	1,498
M1	8,066	413	37	0,073 µg/L	
Café tostado	8,071	704	74	0,142 µg/L	2,353
M2	8,070	723	75	0,150 µg/L	

Las muestras fueron analizadas por duplicado reportando valores de $0,072 \pm 0,001$ y $1,248 \pm 0,003$ µg/L equivalentes a 0,216 y 0,444 ppb de OTA. Los resultados no superan los límites máximos permitidos de 5 ppb OTA en café tostado y molido, establecidos por la Unión Europea.

Tabla 3. Cálculo de Límite de Detección (LDD)

Repetición	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración	Ruido	LLD*
1	7,959	463	75	0,0853 µg/L	5,28	0,020
2	7,955	443	73	0,0804 µg/L	5,40	0,020
3	7,961	460	75	0,0845 µg/L	5,35	0,020
4	7,963	456	73	0,0837 µg/L	5,22	0,020
5	7,978	449	73	0,0819 µg/L	4,81	0,018
6	7,971	448	73	0,0817 µg/L	5,50	0,020
7	7,954	464	75	0,0857 µg/L	5,10	0,019
8	7,954	471	75	0,0872 µg/L	5,01	0,020
9	7,981	455	73	0,0834 µg/L	4,60	0,017
10	7,989	448	71	0,0816 µg/L	5,12	0,019
Promedio	7,964	456,6	73,9	0,0838 µg/L	5,14	0,019

* Se calculó mediante la siguiente fórmula, $LLD = 3,3 \times (\text{Concentración}) \times \text{Ruido/altura del pico}$

CONCLUSIONES

El proceso de extracción, purificación y cuantificación de ocratoxina A en *Coffe arábica* L. “café”, de tipo tostado es aceptable aplicando el método de columna de inmovilización y su detección por fluorescencia, corroborado el nivel concentración de 5 ppb. Las concentraciones de las muestras analizadas no superan el límite permitido por los organismos reguladores.

AGRADECIMIENTOS

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el financiamiento, al Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” y al Laboratorio de Investigación y Certificaciones LABICER de la Universidad Nacional de Ingeniería, por el apoyo brindado durante la ejecución de la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ali R, Ismail M, Bhalli J. Effect of temperature on ochratoxin A production in common cereals by aspergillus species. *J Anim Plant Sci.* 2013;(23)4: 1316-1320.
2. Revalo A, Ruvio C, Gutiérrez A. La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutr Hosp.* 2011; 26(6):1215-1226
3. Binder E, Tan L, Chin L, Handl J, Richard J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim Feed Sci Tech.* 2007;137(3-4):265-282.
4. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas. Roma: FAO; 2004.
5. Commission of the European Communities. Regulation (EC) 1881/2006 of 19/12/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of European Union.* 2006; L364, 5-24.
6. Benites A, Fernandes M, Boleto A, Azevedo S, Silva S, Leitão A. Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. *Food Control.* 2017; 73(2):1223-1228.
7. DIN EN 14132:2009-Foodstuffs: Determination of ochratoxin A in barley and roasted coffee. HPLC method with immunoaffinity column clean-up. EN 14132:2009 Sept. 2009.
8. Neogen. Neocolumn for Ochratoxin WB quantitative test. [Internet][Accesado 15 feb 2020]. Disponible en: <https://foodsafety.neogen.com/en/neocolumn-ochratoxin>
9. Tafuri A, Ferracane R, Ritieni A. Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. *Food Chem.* 2014; 88(4); 487-494.
10. Zhang L, Dou X, Zhang C, Logrieco A, Yang M. A Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines. *Toxins.* 2018;10(2):1-39.
11. Arroyo N, Huertas J, Gamiz L, García A. Control de micotoxinas en alimentos. Granada: Universidad de Granada; 2014 p. 1-16.
12. Moez E, Noel D, Brice S, Benjamin G, Pascaline A, Didier M. Aptamer assisted ultrafiltration cleanup with high performance liquid chromatography-fluorescence detector for the determination of OTA in green coffee. *Food Chem.* 2019;310(1):1-18.
13. Castellanos O, González O, Guyot B, Fontana T, Guiraud J, Schorr-Galindo S, *et al.* Efecto de dos técnicas diferentes de tostado en la reducción de ocratoxina A (OTA) en granos de café (*Coffea arabica*). *Control de alimentos.* 2011;22(8); 1184-1188.
14. Diana Di, Monbaliu S, Scippo M, Maghuin-Rogister G, Schneider Y, Larondelle Y, Callebaut A, *et al.* LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food Addit Contam. Part A.* 2009;26(1):885-895
15. Implvo F, Mendes E, Mbpp O. Quantification of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in pepper by HPLC/fluorescence. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2004;27(1):325-334.
16. Monbaliu S, Wu A, Zhang D, Van Peteghem C, De Saeger S. Multimycotoxin UPLC-MS/MS for tea, herbal infusions and the derived drinkable products. *J Agric Food Chem.* 2010;58(1):12664-12671.
17. Horwitz W, Alber R. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *J AOAC Int.* 2006; 89 (1): 1095-1109.

18. Entwisle AC, Williams AC, Mann PJ, Russell J, Holgura PT, Gilbert J. Combined Phenyl Silane and Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography for Determination of Ochratoxin A in Roasted Coffee: Collaborative Study. *J AOAC Int.* 2001; 84(1): 444–450.
19. Pfohl-Leszkowicz, A, Molinié A, Castegnaro, M. Presencia de ocratoxina A, citrinina y fumonisina B1 en cereales para el desayuno recogidos en el mercado francés. Comparación del análisis de OTA usando o no limpieza de inmunoafinidad antes de HPLC. *Revista Mexicana de Micología.* 2004;19: 7–15
20. Pfohl-Leszkowicz A, Molinié A, Castegnaro M. Subestimación de fumonisina B1 y ocratoxina A, de matrices complejas mediante el uso de columnas de inmunoafinidad. En micotoxinas y ficotoxinas, Acta del XI Simposio Internacional de la IUPAC sobre micotoxinas y ficotoxinas. 17–21 de mayo de 2004; Bethesda, MD, EE. UU.

FUNCIONALIZACIÓN DEL GEL DE POLISILOXANO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y SU CARACTERIZACIÓN

Rosa Aída Balvín Beltrán^a, Julia Lilians Zea Álvarez^{a,b}, Corina Vera Gonzales^{a,b},
Luis De Los Santos Valladares^{c,d,e}, María Elena Talavera Núñez^{a,b}

RESUMEN

En la presente investigación presentamos un compuesto de polisiloxano funcionalizado con nanopartículas de plata (NPs-Ag). Se sintetizó NPs-Ag, por reducción de una solución de nitrato de plata (AgNO_3) con borohidruro de sodio (NaBH_4), las NPs-Ag se caracterizaron por el método espectrofotométrico UV-visible, encontrando que entre 400 – 410 nm se formó el típico pico de las NPs-Ag por la resonancia de plasmón superficial. En el análisis por Dispersión de Luz Dinámica (DLS) de las NPs-Ag se encontró una distribución polidispersa con dos poblaciones de 59,78 nm en un 70 % y de 4,33 nm en un 30%. Seguidamente, se sintetizó el gel de polisiloxano por hidrolización de clorosilano, usando como disolvente éter dietílico, el polisiloxano obtenido se caracterizó por espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). En el espectro se observan picos en la región de 1258,88 cm^{-1} correspondientes al metilo, entre 1000 - 1100 cm^{-1} un pico correspondiente al enlace Si-O-Si y una banda a 792,10 cm^{-1} característica de los siloxanos, confirmando la presencia del polisiloxano.

Se funcionalizó el gel de polisiloxano (PS) con NPs-Ag, obteniéndose un gel de color amarillo lechoso, debido a la absorción por resonancia de los plasmones superficiales. El análisis por DLS del gel de PS-NPs-Ag, mostró una distribución monodispersa con un tamaño promedio de 158,7 nm en un 100 %, debido a que el gel incluye en su estructura las NPs-Ag. Se caracterizó el gel de PS-NPs-Ag por FTIR observándose un pico entre 1000 y 1100 cm^{-1} correspondiente al Si-O-Si y una banda a 803,33 cm^{-1} propia de los siloxanos; asimismo, se observa una banda de absorción a 3384 cm^{-1} correspondiente a las NPs-Ag. En el análisis termogravimétrico (TGA) del gel de PS-NPs-Ag se muestra que a la temperatura de 374,96 °C alcanza el punto de fusión, característico de un polisiloxano y a 630,22 °C la muestra se descompone. Mediante Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) se encontró una concentración de plata de 5,2 ppm. Por SEM-EDX se observa la morfología típica del gel de

^a Departamento Académico de Química, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Código Postal: 04001. Email: mtalaveran@unsa.edu.pe.

^b Laboratorio de preparación, caracterización e identificación de nanomateriales (LAPCI-NANO) de la UNSA.

^c School of Materials Science and Engineering, Northeastern University, No 11, Lane 3, Wenhua Road, Heping District, Shenyang 110819, People's Republic of China.

^d Cavendish Laboratory, Department of Physics, University of Cambridge, J.J. Thomson Ave., Cambridge CB3 0HE, UK.

^e Laboratorio de Materiales Funcionales, Facultad de Ciencias Físicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Ap. Postal 14.0149, Lima, Perú.

PS-NPs-Ag, además se observa una señal que corresponde a la presencia de plata.

Palabras clave: funcionalización, polisiloxano, nanopartículas de plata, gel

FUNCTIONALIZATION OF THE POLYSILOXAN GEL WITH SILVER NANOPARTICLES AND ITS CHARACTERIZATION

ABSTRACT

In the present investigation we present a polysiloxane composite functionalized with silver nanoparticles (NPs-Ag). NPs-Ag was synthesized, by reduction of a silver nitrate solution (AgNO_3) with sodium borohydride (NaBH_4), the NPs-Ag were characterized by the UV-visible spectrophotometric method, finding that between 400 - 410 nm the typical peak of NPs-Ag by surface plasmon resonance. In the Dynamic Light Scattering (DLS) analysis of the NPs-Ag, a polydisperse distribution was found with two populations of 59.78 nm in 70% and 4.33 nm in 30%. Subsequently, the polysiloxane gel was synthesized by hydrolyzing chlorosilane, using diethyl ether as the solvent, the obtained polysiloxane was characterized by infrared Fourier transform spectrophotometry (FTIR). In the spectrum peaks are observed in the region of 1258.88 cm^{-1} corresponding to methyl, between $1000 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ a peak corresponding to the Si-O-Si bond and a band at 792.10 cm^{-1} characteristic of the siloxanes, confirming the presence of the polysiloxane.

The polysiloxane (PS) gel was functionalized with NPs-Ag, obtaining a milky yellow gel, due to the resonance absorption of the surface plasmons. DLS analysis of the PS-NPs-Ag gel showed a monodisperse distribution with an average size of 158.7 nm at 100%, because the gel includes NPs-Ag in its structure. The PS-NPs-Ag gel was characterized by FTIR, observing a peak between 1000 and 1100 cm^{-1} corresponding to Si-O-Si and a band at 803.33 cm^{-1} typical of siloxanes, as well as a band absorption at 3384 cm^{-1} corresponding to NPs-Ag. In the thermogravimetric analysis (TGA) of the PS-NPs-Ag gel it is shown that at the temperature of $374.96 \text{ }^\circ\text{C}$ it reaches the melting point, characteristic of a polysiloxane and at $630.22 \text{ }^\circ\text{C}$ the sample decomposes. Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), a silver concentration of 5.2 ppm was found. SEM-EDX shows the typical morphology of the PS-NPs-Ag gel, and a signal corresponding to the presence of silver is also observed.

Key words: functionalization, polysiloxane, silver nanoparticles, gel

INTRODUCCIÓN

Los polisiloxanos son polímeros inorgánicos que están adquiriendo gran importancia por sus propiedades fisicoquímicas, en su cadena principal presentan átomos diferentes al carbono, en comparación con sus homólogos orgánicos. Los principales polímeros inorgánicos de silicio son los polisilanos, polifosfacenos y polisiloxanos como el polidimetilsiloxano (PDMS), el cual es un derivado del siloxano que presenta propiedades de gran interés como alta flexibilidad, alta estabilidad química, hidrofobicidad, resistencia a la radiación ultravioleta y biocompatibilidad¹.

La tabla 1 lista algunos métodos para funcionalizar polisiloxano con distintos materiales usando diferentes metodologías reportadas en la literatura. Algunos de los materiales funcionales reportados son, sales de amonio cuaternario, nanopartículas de silica, ZrO_2 , ZnO , SiO_2 y Fe_2O_3 ^{2,3}.

Buenas candidatas para la funcionalización de polisiloxanos son las nanopartículas de plata, que destacan por su versatilidad, ya que son aplicables en optoelectrónica, catálisis, procesos de remediación ambiental, aplicaciones biomédicas, por sus propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas y estructurales, fotoactividad, que las promueve como agentes antimicrobianos (bactericidas, fungicidas) y han resultado ideales para marcaje celular⁴.

A pesar de la importancia de las NPs-Ag, hasta el momento hay pocos trabajos que reportan la funcionalización del polisiloxano con estos materiales, la poca literatura reporta la síntesis de una composición de goma de silicona antimicrobiana curable, que comprende una matriz orgánica que contiene nanopartículas de plata metálica de un tamaño de 1 a 50 nm, en una concentración de plata eficaz como antimicrobiano pero no citotóxica de más de 1 nmol/L a menos de 1 μ mol/L⁵.

Asimismo, se obtuvo el compuesto de fibras de nylon con NPs-Ag y evaluadas sus propiedades antimicrobianas. Las NPS-Ag se obtuvieron por reducción del nitrato de plata con ácido ascórbico, borohidruro de sodio y citrato trisódico; que mostraron un tamaño de 50-150 nm y una longitud de onda máxima de 418.5 nm. Las NPs-Ag se depositaron en fibra de nylon con adición de polisiloxano y alcohol polivinílico (PVA) como estabilizador. Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) del compuesto de NPs-Ag-Nylon mostraron picos atribuidos al grupo nanoplata-amida, alcohol vinílico y siloxano. La prueba antibacteriana del compuesto se realizó por el método de unidades formadoras de colonias (UFC). Las nanopartículas de plata coloidal mostraron propiedades antibacterianas para las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En estas pruebas antibacterianas se demostró que la concentración de polisiloxano al 2 % y el tiempo de deposición de 5 minutos dieron la estabilidad del antibacteriano con el tratamiento de varias veces de lavado⁶.

Además se obtuvo una membrana de silicona con partículas de plata para recubrir estent (stent), en el que cumple una función protectora y antibacteriana. Para reducir el crecimiento de tejido o tumor, se colocaron stents metálicos autoexpandibles (SEMS) cubiertos. La efectividad de los SEMS cubiertos puede verse atenuada por la formación de lodos o cálculos o por obstrucción del stent debido a la formación de una biopelícula en la membrana de

cobertura. En este estudio, se probó la hipótesis que una membrana de silicona que contiene partículas de plata (P-Ag) evitaría el lodo y la formación de biopelícula en los SEMS cubiertos. *In vitro*, la membrana de cobertura de polímero de silicona integrada con P-Ag exhibió actividad antibacteriana sostenida, y no hubo liberación definitiva de iones de plata de la membrana de polímero de silicona integrada con P-Ag⁷.

Igualmente, se estudió la incorporación de NPs-Ag en espumas de poliuretano (PU) para ser utilizadas como filtros de agua potable y eliminar la contaminación bacteriana. Se incorporaron nanopartículas de plata en espumas de poliuretano (PU) por exposición nocturna de las espumas en soluciones de nanopartículas, lavado repetido y secado al aire produciéndose una espuma de PU con un revestimiento uniforme, que puede ser utilizada como filtro de agua potable donde la contaminación bacteriana del agua superficial es un riesgo para la salud, las nanopartículas son estables en la espuma y no son arrastradas por el agua. La morfología de la espuma se conservó después del recubrimiento con las nanopartículas, la unión se debe a su interacción con el átomo de nitrógeno del PU. Las pruebas se realizaron con un filtro de agua prototípico. A un caudal de 0,5 L/min, en cuyo tiempo de contacto era del orden de un segundo, en la salida el recuento de *Escherichia coli* fue nulo y el agua de entrada tenía un carga bacteriana de 105 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. Combinado con el bajo costo y efectividad en sus aplicaciones, la tecnología puede tener grandes implicaciones en los países en desarrollo⁸.

También se sintetizaron NPs-Ag usando como precursor el compuesto organometálico $[Ag(C_6F_5)]$ y se caracterizaron. Se efectuaron métodos de síntesis de NPs-Ag por reacciones en disolución modificando parámetros para un control en el tamaño, forma, monodispersidad y superficie de las NPs-Ag, se caracterizaron por espectrofotometría UV-visible mostrando una banda correspondiente al plasmón superficial a 412 nm indicando la presencia de NPs-Ag, esféricas pequeñas. Este resultado se confirmó por microscopía de transmisión electrónica (TEM) observándose NPs-Ag uniformes de 9,8 nm de tamaño. Su naturaleza cristalina se confirma mediante difracción de rayos X de polvos donde se obtiene el patrón característico de la plata metálica con estructura cúbica centrada en las caras⁹.

En el presente trabajo se reporta la funcionalización del gel de polisiloxano con nanopartículas de plata, el polisiloxano fue obtenido por el método de hidrolización del diclorodimetilsilano en agua y éter etílico y funcionalizado con NPs-Ag. Lo que se busca es obtener un nanocomposito con propiedades protectoras, de recubrimiento y bactericidas.

Tabla 1. Fórmulas de Parámetros de Control del Reactor Termófilo.

Método	Síntesis	Caracterización	Referencia
Funcionalización de poli (dimetilsiloxanocometilhidrosiloxano) con sales de amonio cuaternario	Reacción de hidrosililación catalítica.	RNM de ^1H , ^{13}C , y ^{29}Si , con un sistema acoplado de GPC/LS, caracterización fisicoquímica, viscosidad intrínseca (η) peso molecular promedio viscoso (M_v).	[2]
Síntesis de goma de silicona antimicrobiana curable dispersa con nanopartículas plata de tamaño de 1 a 50 nm	En la matriz orgánica goma de organopolisiloxano se dispersó homogéneamente nanopartículas de plata.	Morfología por SEM y TEM. Viscosidad intrínseca (η), tamaño y	[5]
Método Stöber: Nanopartículas de sílica de dos tamaños diferentes con geometría esférica	Las nanopartículas de sílica fueron funcionalizadas con 3-aminopropiltrimetoxisilano (AMPS) en medio básico.	Se determinó efectividad de la funcionalización de las nanopartículas por ^{29}Si RMN, FTIR y TGA, su tamaño y morfología por SEM y TEM, su estabilidad por TGA.	[3]
Obtención de hule silicón con trimetoxipropilsilil isocianato (ITPS) y NPs- SiO_2	Polimerización aniónica viviente	Espectrofotometría de escaneo UV-VIS-NIR, SEM, TEM, AFM, ATG.	[10]
Determinación de la influencia de la humedad relativa (HR) en nanopartículas coloidales de SiO_2	La nanosilice coloidal si se expone a ambientes con alta HR, forma nanopartículas esféricas aglomeradas de sílice amorfa con menor cantidad de grupos de silanol en la superficie	Espectrofotometría TEM-EDS, ESEM-EDS, XRD, DTA-TG. Microscopía SEM	[11]
Se incorpora NPs en el sistema de recubrimiento epóxico	Incorporación de nanopartículas: ZrO_2 , ZnO , SiO_2 , y Fe_2O_3 , de refuerzo. El stents tiene actividad antibacteriana sostenida.	Propiedades mecánicas, TGA, TEM, SEM	[12]
Para reducir el crecimiento de tejido, se han colocado stents metálicos autoexpandibles (SEMS) con recubrimientos de silicona con P-Ag	El stents tiene actividad antibacteriana sostenida.	Recubrimientos de membrana de silicona que contienen partículas de plata (P-Ag)	[7]
Se incorporaron nanopartículas de plata en espumas de poliuretano (PU)	Exposición nocturna de las espumas a soluciones de nanopartículas de plata.	Las nanopartículas de plata son estables en la espuma de PU y en un filtro tienen propiedades antibacterianas.	[9]

Fuente: Elaboración propia

PARTE EXPERIMENTAL

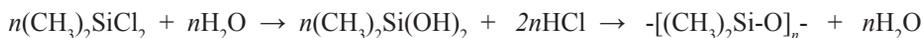
1. Síntesis de nanopartículas de plata

La síntesis de nanopartículas de plata se realizó por reducción de nitrato de plata (AgNO_3) 1 mM, con borohidruro de sodio (NaBH_4) 2mM, con agitación constante, produciéndose la siguiente reacción:



2. Obtención del gel de polisiloxano

Para la obtención del gel de polisiloxano se mezcló éter dietílico con diclorodimetilsilano en un matraz con refrigerante a reflujo colocado sobre un agitador magnético. Se adicionó 10 ml de agua gota a gota, manteniendo la agitación por 10 min. Transcurrido este tiempo, se extrajo la mayor cantidad de agua posible con una pipeta Pasteur. A continuación se agregó al matraz por la parte superior del refrigerante 5 ml de disolución de bicarbonato de sodio al 10 % gota a gota y manteniendo la agitación. Una vez que el desprendimiento gaseoso se detuvo, se retiró el refrigerante y se separó la mayor parte de la fase acuosa de la orgánica usando una pipeta Pasteur. Se comprobó el pH de la fase acuosa resultante neutralizando hasta que la fase acuosa no presentó pH ácido. La disolución etérea resultante se secó añadiendo MgSO_4 anhidro y filtrando (lavando luego con dos porciones de éter) pasando el polímero a la fase orgánica. La reacción que se produce es la siguiente:



En la figura 1 se observan imágenes de la secuencia de síntesis del polisiloxano, la cual se realiza en tres etapas.



Figura 1. Secuencia de síntesis del polisiloxano a) Éter con diclorodimetilsiloxano b) Equipo de reacción a reflujo c) Polisiloxano.

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 2 se muestran las características fisicoquímicas del polisiloxano obtenido, como color, olor, textura, solubilidad.

Tabla 2. Fórmulas de Parámetros de Control del Reactor Termófilo.

Color	Traslucido
Olor	Característico a silicona
Textura	Aceitoso
Solubilidad	Soluble en alcohol, éter dietílico, insoluble en agua

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 2 se listan las características fisicoquímicas del polisiloxano obtenido. Se efectuaron pruebas de solubilidad para elegir el solvente adecuado para realizar la funcionalización del polisiloxano con nanopartículas de plata, de acuerdo a los resultados obtenidos se escogió el éter dietílico como disolvente.

3. Funcionalización del polisiloxano

Para la funcionalización del polisiloxano, se disolvió 3 ml de poliepóxido con éter dietílico en la proporción de 1:2 se mezcló con 3 ml del polisiloxano y se añadió 3 ml de solución de nanopartículas de plata, agitando en un zonicador por 20 minutos a temperatura ambiente para dispersar las nanopartículas y asegurar que no se formen agregados. En la figura 2 se observa la imagen del polisiloxano funcionalizado:

**Figura 2.** Nanocomposito de polisiloxano funcionalizado con NPs-Ag.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 2 se observa que al funcionalizar el polisiloxano con nanopartículas de plata, se forma un gel de color amarillo opalescente.

A continuación, en la figura 3 tenemos el diagrama de bloques del proceso de obtención del polisiloxano funcionalizado con nanopartículas de plata, el cual se realizó en tres etapas:

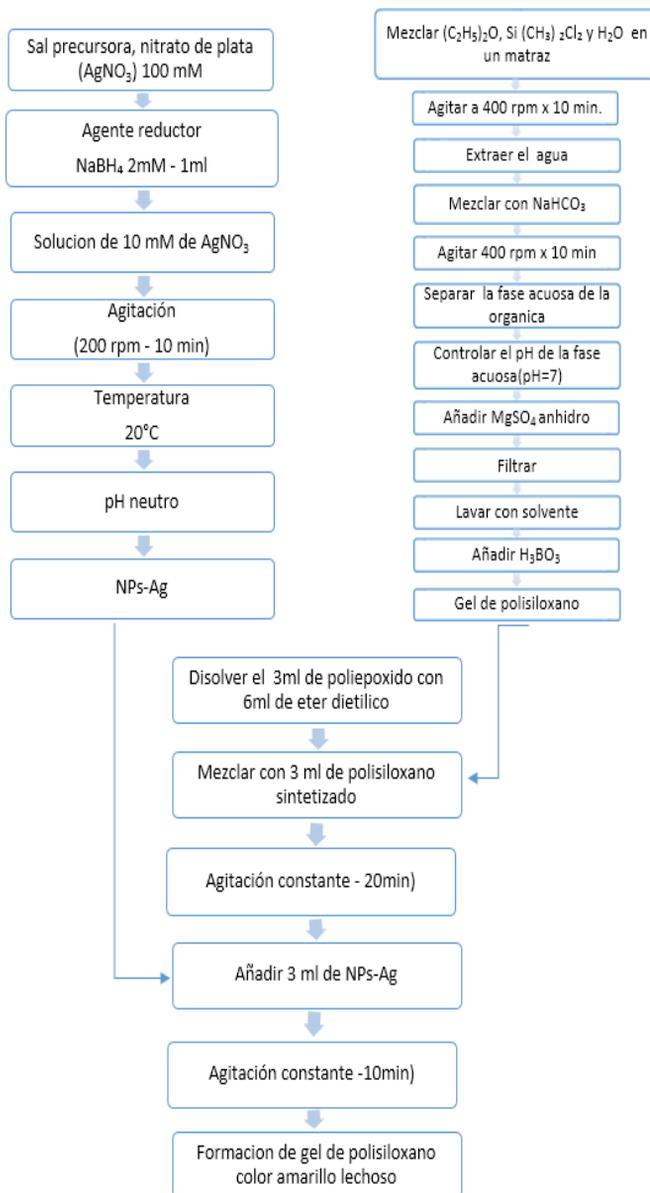


Figura 3. Diagrama de bloques del proceso de obtención del polisiloxano funcionalizado con NPs-Ag.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 3 se observa el diagrama de bloques del proceso de obtención del polisiloxano funcionalizado con NPs-Ag, que se realizó en tres etapas: en la primera se sintetizó y caracterizó las NPs-Ag, en la segunda se obtuvo el gel de polisiloxano y en la tercera se funcionalizó el gel de polisiloxano con NPs-Ag.

4. Caracterización de las NPs-Ag y del nanocomposito

La caracterización de las NPs-Ag se realizó por espectroscopia de absorción de luz UV-Visible, en un equipo SPECTRONIC© 20 GENESYS TM con celdas de cuarzo con 1 cm de longitud de paso óptico, con un rango espectral de 300 a 1100 nm. Asimismo, se caracterizaron por Dispersión de Luz Dinámica (Dynamic Light Scattering) usando un equipo DLS marca ZETASIZER NANO ZS.

El gel de polisiloxano se caracterizó en un Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR), marca Nicolet iS50 FT-IR de Thermo Scientific, en el rango espectral de 800 a 4000 cm^{-1} de longitud de onda y con 4 cm^{-1} de resolución, igualmente, se hizo el análisis termogravimétrico (TGA) en un equipo marca Discovery SDT 650 en celdas de porcelana con flujo de aire y una velocidad de calentamiento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$, desde la temperatura ambiente hasta 630°C . Se caracterizó por SEM-EDX en un equipo marca Carl Zeiss, EVO 10 MA, con un voltaje de aceleración en el rango de 1 a 20 KV y corriente de haz de 1 a 500 Pa y detector de electrones secundarios, acoplado a un analizador por EDX. Asimismo, se caracterizó por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivamente ICP-MS, en un equipo marca iCAP TQ ICP-MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la obtención de las NPs-Ag, se observó una coloración amarilla que indica la formación de las nanopartículas, este color es debido a la absorción por la resonancia de los plasmones superficiales. El seguimiento de la formación de NPs-Ag fue por espectroscopia UV-Visible, el espectro se presenta en la figura 4.

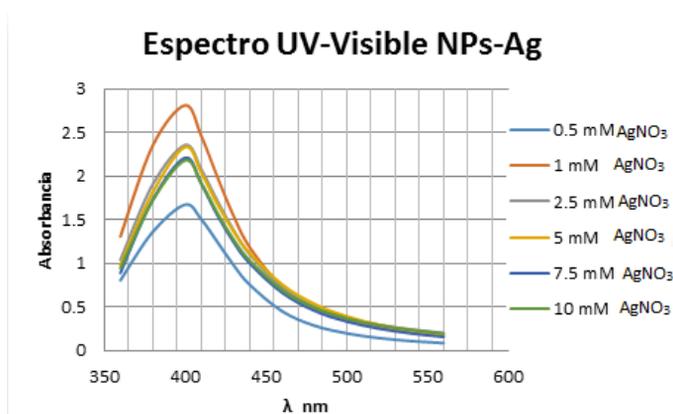


Figura 4. Espectro UV-Visible de las nanopartículas de plata

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 4 del Espectro UV-Visible de las NPs-Ag, se observa un máximo de absorbancia en la longitud de onda entre 400 a 410 nm, debido a la absorción por resonancia de los plasmones superficiales. Esto se produce debido a los electrones libres en la banda de conducción de la superficie de las nanopartículas, que reciben un haz de luz incidente, esto induce a una excitación de estos electrones libres y, como consecuencia, se produce una oscilación coherente deslocalizada de los electrones de la superficie de las nanopartículas metálicas, la excitación electromagnética se llama polaritón del plasmón de superficie. Para determinadas frecuencias de la energía incidente, se produce un acoplamiento entre las frecuencias de la onda incidente y de la oscilación del polaritón; a este fenómeno se le llama resonancia del plasmón de superficie y tiene la capacidad de absorber determinadas frecuencias de la luz incidente y de transmitir las frecuencias no absorbidas, lo que se asocia a un determinado color¹³. Se experimentó con varias concentraciones de AgNO_3 , se eligió para trabajar la concentración 1mM en la que el espectro es más estable por presentar el pico más alto y definido.

En la evaluación del tamaño de las nanopartículas de plata y del polisiloxano funcionalizado con nanopartículas de plata se usó la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). En la figura 5 se muestran los histogramas correspondientes.

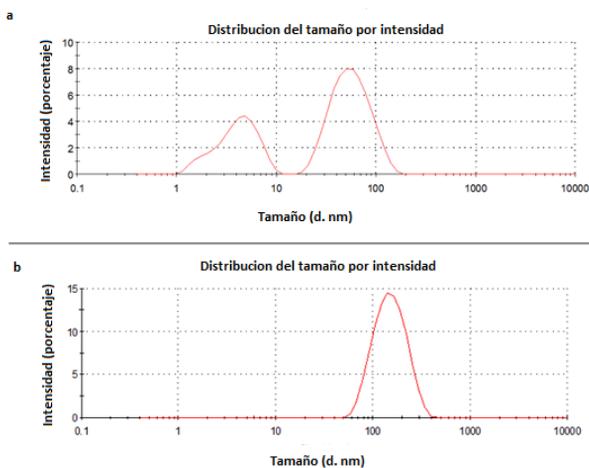


Figura 5. (a) Histograma de los diámetros hidrodinámicos de las NPs-Ag, 5 (b) Histograma del nanocomposito de PS-NPs-Ag por DLS
Fuente: Elaboración propia.

En la figura 6 (a) correspondiente al espectro FTIR del polisiloxano se observa que en la región de $1258,88\text{ cm}^{-1}$ aparecen las deformaciones simétricas correspondientes al dimetilo. A $1000\text{ cm}^{-1} - 1100\text{ cm}^{-1}$ aparece una doble banda correspondiente a cambios en la distancia del enlace Si-O-Si (“stretching”) y a $792,10\text{ cm}^{-1}$ se observa las bandas correspondientes a modificaciones en el ángulo del enlace CH_3 (“rock”) y los cambios en la distancia del enlace Si-C (“stretching”) con lo que queda confirmada la síntesis del polisiloxano por la presencia de los grupos del siloxano.

En la figura 6 (b) correspondiente al espectro por FTIR del polisiloxano epóxico, se observa el pico del grupo oxirano en la región $970\text{ cm}^{-1} - 914\text{ cm}^{-1}$, característico del grupo epoxi, en el rango de $1000\text{ cm}^{-1} - 1100\text{ cm}^{-1}$ se observa una doble banda correspondiente a cambios en la distancia del enlace Si -O- Si (“stretching”), a $803,33\text{ cm}^{-1}$ se observan las bandas correspondientes a modificaciones en el ángulo del enlace CH_3 (“rock”) y a los cambios en la distancia del enlace Si- C (“stretching”) picos característicos del polisiloxano.

En la figura 6 (c) correspondiente al espectro por FTIR del polisiloxano epóxico funcionalizado con nanopartículas de plata, se observa una banda ancha de absorción a 3384 cm^{-1} provocada por la tensión del -OH proveniente de las moléculas de agua asociadas a la solución de nanopartículas de plata, asimismo se evidencia el pico 1581 cm^{-1} característico de la plata, además de los picos característicos del polisiloxano.

Comparando las figuras 6(a), 6(b) y 6(c) referidas a los resultados del FTIR de los polisiloxanos, que fueron caracterizados a fin de determinar de manera experimental sus principales bandas (correspondientes a los enlaces presentes en sus estructuras químicas), y posteriormente determinar el efecto de la funcionalización del polisiloxano con nanopartículas de plata. En todos los casos se observan picos similares entre 792 cm^{-1} y 825 cm^{-1} por el estiramiento del enlace Si-C, entre 1000 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} por el estiramiento del enlace Si-O-Si, entre 1101 cm^{-1} y 1258 cm^{-1} debidos al estiramiento del enlace Si-O. También son evidenciadas bandas características para cada uno de ellos: a 914 cm^{-1} corresponde los grupos epoxi ($\text{CH}_2\text{-O-CH-}$), a 1581 cm^{-1} característico de la plata, una banda ancha de absorción a 3384 cm^{-1} por las moléculas de agua asociadas a la solución de nanopartículas de plata.

Seguidamente, en la figura 7 a) se muestra la caracterización del polisiloxano¹⁵ y en la figura 7 b) la caracterización del polisiloxano funcionalizado con nanopartículas de plata en el analizador termogravimétrico (TGA).

El intervalo de temperatura del ensayo abarcó desde la temperatura ambiental de 24°C hasta 631°C . Una vez calibrado el equipo de TGA se pesó la muestra, se colocó en un crisol de porcelana y luego en la balanza que está incorporada en el equipo TGA.

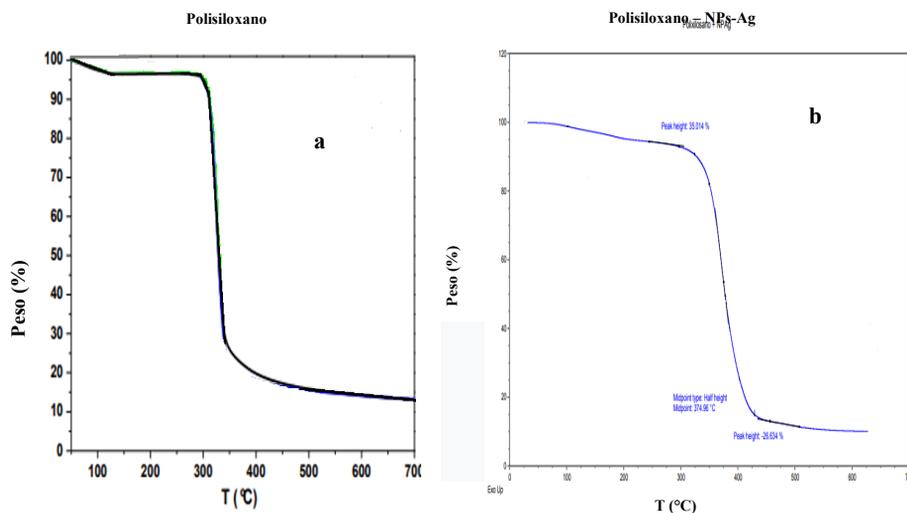


Figura 7. a) Análisis termogravimétrico del polisiloxano15, 7 b) Análisis termogravimétrico del nanocomposito del polisiloxano funcionalizado con nanopartículas de plata.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 7 a) se observa una pequeña disminución del peso a una temperatura cercana a 110°C que corresponde a la pérdida del agua presente en la muestra y luego una disminución importante a 325°C que corresponde al punto de fusión del polisiloxano, a 610 °C la muestra se descompone totalmente¹⁵.

En la figura 7 b) se observa una pequeña disminución del peso a una temperatura cercana a 100 °C que corresponde a la pérdida del agua presente en la muestra y luego una disminución importante a 374,96°C que corresponde al punto de fusión del polisiloxano funcionalizado con nanopartículas de plata, a 630,22 °C la muestra se descompone totalmente, desprendiendo gases, estas lecturas nos indican que el PMS-NPs-Ag tiene buena resistencia térmica.

Comparando los termogramas 7 a) y 7 b), en el del polisiloxano, se observa que el punto de fusión es a 325°C, en el termograma del PMS- NPs- Ag el punto de fusión es 374,96 °C por lo que se puede indicar que la presencia de NPs-Ag en el PMS- NPs- Ag hace que aumente el punto de fusión y por lo tanto la resistencia térmica del material.

El polidimetilsiloxano conserva sus propiedades físicas en un rango de temperatura amplio (-100 °C a 250 °C), tiene flexibilidad a bajas temperaturas, es resistente a altas temperaturas y oxidación, tiene buena estabilidad en ambientes químicos, fisiológicos y buena resistencia a la intemperie, repelencia al agua y propiedades dieléctricas¹⁶.

En la caracterización del polisiloxano funcionalizado con nanopartículas de plata por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivamente ICP-MS, se encontró 5,2 mg/L de plata, como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Análisis por ICP-MS del polisiloxano funcionalizado con nanopartículas de plata.

N°	ELEMENTO	LECTURA mg/L
1	Aluminio total	0,13
2	Antimonio Total	<0,00005
3	Arsénico Total	0,00004
4	Bario Total	0,0321
5	Berilio Total	<0,00002
6	Bismuto Total	0,00008
7	Boro Total	0,039
8	Calcio Total	0,43
9	Cadmio Total	0,00001
10	Cerio Total	0,00019
11	Cobalto Total	0,00006
12	Cobre Total	0,002
13	Estaño Total	0,00015
14	Estroncio Total	0,0074
15	Fosforo Total	<0,02
16	Hierro Total	0,04
17	Litio Total	0,00058
18	Magnesio Total	0,05
19	Manganeso Total	0,0009
20	Mercurio Total	<0.0005
21	Molibdeno Total	0,00005
22	Níquel Total	0,0004
23	Potasio Total	<0,02
24	Plata Total	5,2
25	Plomo Total	0,0004

Fuente: Elaboración propia

La tabla 4 corresponde a los resultados de ICP-MS, se encontró 5,2 mg/L de plata, confirmando que las nanopartículas de plata se incorporaron en la estructura del polisiloxano.

En la figura 8 se observa la microfotografía del nanocomposito del polisiloxano funcionalizado con nanopartículas de plata por SEM-EDX.

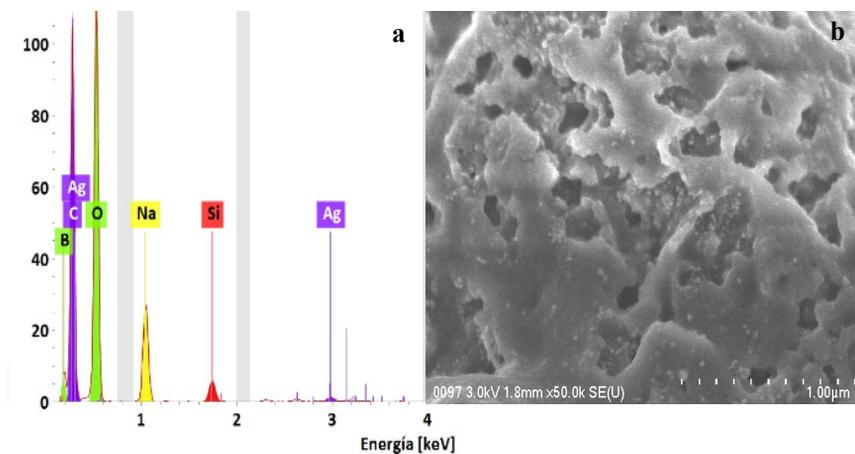


Figura 8. Microscopía electrónica de barrido del polidimetilsiloxano funcionalizado con nanopartículas de plata: a) Imagen de EDX y b) Imagen de SEM.
Fuente: Elaboración propia.

Dispersión de energía (EDX), proporciona información complementaria en cuanto a la composición química de la muestra, se observan diferentes señales que muestran mayor proporción de plata por la presencia de nanopartículas de plata. Las zonas grises: 1, 2, 3, pertenecen a zonas sin lecturas.

La figura 8 (b) que corresponde a la microfotografía del PS-NPs-Ag tomada por SEM, presenta una magnificación de las superficies de 10 mil veces, se observa la morfología típica de un gel, siendo las fases más dominantes, en este caso corresponden al gel de polisiloxano funcionalizado con nanopartículas de plata.

CONCLUSIONES

Se obtuvo nanopartículas de plata por reducción del nitrato de plata AgNO_3 con borohidruro de sodio y se caracterizaron por espectroscopía UV-visible, presentando un plasmón con un máximo de absorbancia a 400 nm. Se encontró el tamaño hidrodinámico de las NPs-Ag por dispersión de luz dinámica (DLS), el histograma mostró una distribución polidispersa de dos poblaciones de 59,78 nm en un 70 % y de 4,33 nm 30 %.

Se sintetizó el polisiloxano por el método de hidrolización del clorosilano en agua y éter dietílico el cual se funcionalizó con NPs-Ag, que se caracterizó por espectrofotometría infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR), en el que se observaron picos en la región de $1258,88 \text{ cm}^{-1}$ correspondientes al metilo, a $1000 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ un pico correspondiente al

enlace Si-O-Si y una banda a $792,10\text{ cm}^{-1}$ característica de los siloxanos, confirmándose la presencia del polisiloxano, además se evidencia un pico a 1581 cm^{-1} característico de la plata.

En la caracterización del PMS-NPs-Ag por análisis termogravimétrico (TGA) se encontró el punto de fusión a $374,96^\circ\text{C}$ y el punto de descomposición a $630,22^\circ\text{C}$, lo que indica que la muestra tiene buena resistencia térmica, teniendo en cuenta que en el (TGA) del polisiloxano el punto de fusión es a 325°C y el punto de descomposición a 610°C se demuestra que la presencia de NPs-Ag en el PMS-NPs-Ag, hace que aumente el punto de fusión y la resistencia térmica del material.

Por ICP Masas se encontró $5,2\text{ ppm}$ de plata en el gel de polisiloxano funcionalizado con NPs-Ag. Por SEM-EDX, se observó la morfología típica de un gel, por EDX se observan diferentes señales que revelan mayor proporción de plata, lo que se confirmó la presencia de plata en el gel de polisiloxano funcionalizado con NPs-Ag.

AGRADECIMIENTO

Al Proyecto de Investigación Básica y Aplicada IBA-045-2016 – UNSA, titulado: “Funcionalización de un gel de polisiloxano con nanopartículas de plata y su potencial aplicación como recubrimiento para evitar la degradación del sillar (IGNIMBRITA)”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Meléndez Z, Gasca J, Jáuregui J, Amavisca M. Polisiloxanos Materiales para aplicaciones de alta tecnología. Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas. XII Encuentro Participación de la mujer en la Ciencia. México; 2016.
2. Guerra J, Villegas J. Síntesis y caracterización de un polisiloxano funcionalizado: Estudio de sus propiedades en un disolvente polar. *Naturaleza y Tecnología*. 2013; 2: 22-26.
3. Echeverri M, Giraldo L, López B. Síntesis y funcionalización de nanopartículas de sílica con morfología esférica. *Revista Scientia et Technica, Universidad Tecnológica de Pereira*. 2007; 1(36): 169-173.
4. Gómez T, Arroyo MA, Hernández G, Acosta LS. Nanopartículas de plata: Aplicaciones biomédicas. [Internet] Repositorio Académico Digital de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). *Química Hoy*, 2013; 3 (3). ISSN 2007-1183. [Accesado 7 ene 2020]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/3508/>
5. Hanke B. Síntesis de goma de silicona antimicrobiana curable dispersa con nanopartículas plata de tamaño de 1 a 50 nm. España Patente N° 2286026. 2007
6. Laksmono J, Haryono A, Handaya A. Functionality of Polysiloxane in the Attachment of Silver Nanoparticles on Nylon Fiber Surface. *IJMSE*. 2014; 5(12): 2045-7057.

7. Lee TH, Jang BS, Jung MK, Pack CG, Choi JH, Park DH. Fabrication of a silver particle-integrated silicone polymer-covered metal stent against sludge and biofilm formation and stent-induced tissue inflammation. *Sci Rep.* 2016;6:35446. doi:10.1038/srep35446
8. Jain P, Pradeep T. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnol Bioeng.* 2005; 90(1):59-63.
9. Monge M. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *An R Soc Esp Quím.* 2009; 1(1): 33-41.
10. Yevevino C. Síntesis de materiales súper hidrófobos mediante la funcionalización de nanopartículas de sílice en hule silicona empleando polimerización aniónica viviente. [Tesis de maestría]. Saltillo, Coahuila (México): Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA); 2013.
11. Zornoza-Indart A, López-Arce P. (2016) Silica nanoparticles (SiO₂): Influence of relative humidity in stone consolidation. *J Cult Herit.* 2016; 18: 258-270.
12. Boumaza M, Khan R, Zahrani S. An experimental investigation of the effects of nanoparticles on the mechanical properties of epoxy coating. *Thin Solid Films.* 2016; 620: 160-164.
13. Sánchez M. Nanopartículas de plata: Preparación, caracterización y propiedades con aplicación en inocuidad de los alimentos. [Tesis de master]. España: Universidad Nacional de Educación a Distancia (España). Facultad de Ciencias. Departamento de Química Inorgánica y Química Técnica; 2017
14. Portillo D. Potencial de Nanopartículas de plata inmovilizadas mediante la técnica de ultrasonido recubiertas en corcho granular como agente microbiano. [Trabajo de fin de master]. Barcelona: Universidad Politécnica de Cataluña; 2015.
15. Qunwei Xu. Efecto de Pseudopolirrotaxanos como nanorrefuerzos en matrices poliméricas. Leganés, Madrid: Universidad Carlos II de Madrid Leganés, Escuela Politécnica Superior; 2012.
16. Prolongo SG. (2003). Termoestables Híbridos Órgano Inorgánicos. Síntesis, Caracterización y Propiedades. [Tesis Doctoral]. Leganés, Madrid: Universidad Carlos III de Madrid, España.

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DEL EXTRACTO DE ALGARROBO UTILIZANDO FRUCTOSILTRANSFERASAS

Carmen Peña-Suasnabar*, Amparo Iris Zavaleta

RESUMEN

Los fructooligosacáridos (FOS) son polímeros de fructosa, unidos mediante enlaces glucosídicos $\beta(2-1)$, considerados edulcorantes de bajo aporte calórico con función prebiótica que pueden ser obtenidos a partir de sacarosa por biosíntesis. Los frutos del algarrobo (*Prosopis pallida*) contienen principalmente carbohidratos y, en particular, alta concentración de sacarosa. Por tal motivo, se optimizó la producción de FOS a partir del extracto de algarrobo usando pectinasa de *A. aculeatus*. La metodología de superficie de respuesta se aplicó para optimizar los parámetros que afectan la producción como: tiempo, temperatura y extracto de algarrobo; después se verificaron experimentalmente. El proceso de biosíntesis de FOS se realizó con extracto de algarrobo a las concentraciones de 20, 35 y 50 °Bx, pectinasa a 10, 35 y 61 mg, a 45, 55 y 65 °C durante 0,5; 9,5 y 18 h, con agitación a 150 rpm. Los métodos de análisis para glucosa y FOS fueron glucosa oxidasa y AOAC 999,03 respectivamente y el programa Minitab 16. Las condiciones óptimas de reacción para la producción de FOS fueron: extracto de algarrobo 38 °Bx, pectinasa 31 mg, 54 °C, 150 rpm y 12 h. El rendimiento experimental en el extracto transformado fue FOS 16,1 % cuantificados por HPLC.

Palabras clave: fructooligosacáridos, FOS, algarrobo, *Prosopis pallida*, pectinasa

OPTIMIZATION OF A FRUCTOOLIGOSACCHARIDES PRODUCTIVE PROCESS FROM CAROB EXTRACT USING FRUCTOSILTRANSFERASES

SUMMARY

Fructooligosaccharides (FOS) are fructose polymers, linked by β -glucosidic bonds (2-1), considered low caloric food sweeteners with prebiotic function and can be obtained from sucrose by biosynthesis. The fruits of the carob tree (*Prosopis pallida*) contain mainly carbohydrates where sucrose stands out. For this reason, the production of FOS from carob

Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima 1, Perú
Carmen.pena@unmsm.edu.pe

extract was optimized using a pectinase from *A. aculeatus*. The response surface methodology using was applied to optimize the parameters that affected production: time, temperature and carob extract; then they were verified experimentally. The biosynthesis process of FOS was carried out with carob extract at the concentrations of 20, 35 and 50 ° Bx, Pectinase at 10, 35 and 61mg, at 45, 55 and 65 °C for 0,5, 9,5 and 18 h, with stirring at 150 rpm The analysis methods were glucose oxidase and AOAC 999.03, for glucose and FOS respectively and the Minitab 16 program. The optimal reaction conditions for the production of FOS were: carob extract 38 °Bx, enzyme 31 mg, 54 °C, 150 rpm and 12 h. The experimental yield in the transformed extract was FOS 16, 1% quantified by HPLC.

Key words: fructooligosaccharides, FOS, carob, *Prosopis pallida*, pectinase

INTRODUCCIÓN

Prosopis pallida (algarrobo) es una leguminosa que crece de manera silvestre en las regiones áridas principalmente del norte peruano desde tiempos ancestrales, produce vainas (algarrobas) de hasta 30 cm de largo, con elevado contenido de carbohidratos. Las algarrobas contienen: sacarosa 46 %, proteínas 8 %, grasas 0,7 % y fibra 32 %¹.

Los carbohidratos tipo fructanos están formados por polímeros de fructosa, unidos mediante enlaces glucosídicos del tipo β (2-1), son conocidos como oligofructanos, tienen un grado de polimerización entre tres y nueve unidades de monosacáridos². Los FOS están presentes en diversas especies vegetales como betarraga, alcachofa, entre otros. Asimismo, estos compuestos se producen por hidrólisis enzimática de inulina, levano, entre otros, o por reacciones de síntesis mediante la acción de transferasas e invertasas en un medio rico en sacarosa³. Los FOS contienen un residuo terminal de α -D-glucosa, y entre ellos destaca: 1-kestosa (GF2), 1-nistosa (GF3) y 1F-fructosilnistosa (GF4)⁴. Este bioproceso genera FOS y glucosa libre, siendo esta última directamente proporcional al proceso de transfructosilación.

En los últimos años, se han descrito enzimas que presentan actividad fructosiltransferasa, tales como invertasas, inulinasas, pectinasas, entre otras. Así, la pectinasa de *Aspergillus aculeatus* presenta actividades de pectinatraneliminasa, poligalacturonasa, pectinesterasa, β -galactosidasa, fructosiltransferasa, hemicelulasa y celulasa. Esta enzima, por presentar alta actividad fructosiltransferasa, es utilizada en la producción de FOS a partir de sacarosa. La eficiencia de conversión se mejora mediante la eliminación simultánea de glucosa a través de una reacción enzimática⁵. En este aspecto, la disponibilidad del extracto de algarrobo con alta concentración de carbohidratos motivó la producción de FOS con el propósito de poner en valor a los frutos subutilizados de esta leguminosa.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y reactivos. Las vainas de algarrobo (algarroba) se recolectaron de la provincia de Piura, distrito de Catacaos a 28 m de altitud. Las algarrobas fueron seleccionadas, pesadas y secadas a 42 °C hasta peso constante. Luego, las vainas fueron molidas, la harina se cernió con tamices de poros 4 y 1 mm. Por otro lado, los reactivos utilizados fueron: pectinasa de *Aspergillus aculeatus*, Merck (EE.UU.), glucosa oxidasa, Valtek (Chile) y Fructan Kit, Megazyme (EE.UU.). Los estándares de 1-cestosa, nistosa, sacarosa, glucosa y fructosa, Sigma Chemical (EE.UU.). Los otros productos químicos fueron adquiridos de Merck Peruana.

Preparación y análisis del extracto de algarrobo. En un recipiente de acero inoxidable se mezcló la harina de algarroba con agua en una relación de 1:5 (peso/volumen) y se calentó a 80 °C por 2 h. Después, la mezcla se filtró y el extracto se concentró a 50 °Brix. Al extracto se determinó los sólidos solubles totales (SST) utilizando un refractómetro manual (Giardino, Italia), la actividad de agua a 25 °C utilizando el método AOAC 978.18. El pH se determinó con un potenciómetro digital (Hanna, Rumania). Los contenidos de azúcares se analizaron usando el método de glucosa oxidasa, DNS y Fructan kit.

Optimización de la producción de FOS. El diseño Box-Behnken se utilizó en la optimización de la producción de FOS usando pectinasa. Para ello, se consideraron cuatro factores: tiempo (h), temperatura (°C), concentraciones de enzima (mg/ml) y extracto de algarrobo (°Bx). Así, se obtuvieron 27 ensayos y seis puntos centrales que se ejecutaron en tres bloques. Los rangos de los parámetros evaluados fueron de 20 a 50 °Bx de extracto de algarrobo, pectinasa de 5 a 30 µL, tiempo de 0,5 a 18 h y temperatura de 45 a 65 °C, siendo variables independientes del proceso. El resultado de 10 de los 54 experimentos se presenta en la tabla 1. Para cada ensayo se mezcló pectinasa y extracto de algarrobo 1 mL. La enzima se inactivó a 100 °C durante 5 min. Posteriormente, las concentraciones de glucosa, azúcares reductores y FOS se determinaron usando glucosa oxidasa, DNS y Fructan Kit, respectivamente.

La metodología de superficie de respuesta se aplicó al optimizar los datos experimentales utilizando Minitab (versión 16). La ecuación de regresión permitió describir la relación entre la respuesta (FOS y glucosa libre) y los términos incluidos en el modelo, las condiciones óptimas obtenidas por el paquete estadístico fueron ensayadas y los azúcares cuantificados por HPLC.

Tabla 1. Matriz del diseño Box-Behnken para optimizar la producción de FOS.

N° de ensayo	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Enzima (μl)	Extracto de algarrobo (°B)
1	9,25	45	17,5	20
2	18,00	55	5,0	35
3	9,25	65	17,5	50
4	9,25	65	17,5	20
5	18,00	55	17,5	50
6	9,25	45	17,5	50
7	18,00	45	17,5	35
8	18,00	45	17,5	35
9	9,25	55	5,0	50
10	18,00	55	17,5	50

La significancia estadística al 95 % de confianza, en términos de la ecuación de regresión, se examinó mediante análisis de varianza (ANOVA). Se generaron gráficas de contorno y superficie de respuesta después del análisis por el mismo software.

Cuantificación de carbohidratos en condiciones óptimas de producción de FOS Se realizó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con un sistema isocrático combinado con detección por índice de refracción para el análisis de carbohidratos. Se aplicaron 20 μL de muestra en una columna Aminex HPX 42- (BioRad, Richmond), con un flujo de 0,6 mL/min, a aproximadamente 52 bars y 81,7 °C; el solvente fue agua mili-Q. Los resultados se analizaron mediante BioCrom, versión 3,0. La interpretación y la cuantificación se realizaron comparando los tiempos de retención y la concentración de las soluciones de carbohidratos estándares. Así, sacarosa, glucosa, fructosa y fructooligosacáridos se prepararon a la concentración de 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mg/ml.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La harina de los frutos de *Prosopis pallida* es utilizada en alimentación animal y en menor proporción en humanos, esta harina contiene carbohidratos entre 40 % y 60 %, corresponde a fructosa, glucosa y sacarosa⁷. Además de estos carbohidratos existen galactomananos provenientes del endospermo de las semillas, que presentan unidades de galactosa y manosa con enlaces en posición β-1,4 que unen varias ramas de D-galactosa mediante enlaces glicosídicos (1,6) cada cuatro o cinco manosas, estos últimos representarían hasta 20 % dependiendo del suelo y la variedad del cultivo⁵. El análisis proximal de la harina de algarrobo realizado para esta investigación presentó la siguiente composición: carbohidratos 75,5 %, proteínas 5,7 %, grasa 2,1 %, cenizas 8,1 %; y humedad 8,6 %.

Características físico químicas del extracto de algarrobo. Para obtener el extracto de algarrobo se ensayaron tres concentraciones de harina de algarrobo 10 %, 20 % y 30 %, alcanzando 15, 30 y 40 °Bx, respectivamente, después de ser concentrado a un mismo volumen, lo cual demuestra una mayor recuperación de carbohidratos al 20 % de harina. Finalmente, se preparó el extracto de algarrobo llevándolo hasta una concentración de 50 °Bx. El pH y la actividad de agua fueron de $4,5 \pm 0,01$ y 0,9, respectivamente. Además, el extracto de algarrobo contenía sacarosa 23,82 %, glucosa 9,74 % y fructosa 10,53 % y oligosacáridos 4,5 %; estos valores comparados con el jugo de caña de azúcar que presenta: fructuosa 2,0 %, glucosa 2,0 % y sacarosa 75,0 %⁶ indican que el extracto de algarrobo posee una tercera parte de sacarosa con respecto al de caña de azúcar, concentración importante para su aprovechamiento en la biosíntesis de FOS.

Asimismo, en el extracto de algarrobo se determinaron los siguientes minerales expresados en mg/kg: hierro 6, calcio 462, magnesio 372, zinc 6 y fósforo 899, lo cual indica que este producto es una fuente de carbohidratos y minerales para la alimentación.

Producción enzimática de FOS. En la actualidad, la obtención de FOS se realiza por hidrólisis enzimática de inulina y lévano o por reacciones de síntesis enzimática de hidrólisis y transferencia de fructosas a concentraciones de sacarosa mayores a 100 g/l, en estas condiciones la invertasa transfiere específicamente moléculas de fructosa a glucosa o sacarosa y forma FOS³. En la biosíntesis de FOS a partir de sacarosa se utilizan diversas enzimas comerciales tales como: inulinasas, invertasas, celulasas, levansacarosas con actividad fructosiltransferasa que catalizan la transferencia de un grupo fructosilo desde una sacarosa a diferentes aceptores, entre ellos, otra molécula de sacarosa, produciendo FOS, estas enzimas pueden estar libres o inmovilizadas, también se utilizan células vivas como *Pichia pastoris* transgénica, entre otros⁷.

En la producción de FOS a partir de sacarosa se evaluaron diferentes factores y condiciones, así Rubio *et al*⁵ utilizaron invertasa de *Aspergillus niger* IB56 y estudiaron el pH a 3,0; 4,0; 4,5; 5,0 y 5,5; temperaturas 20, 25, 30 y 40 °C, concentración de sacarosa 15,0; 30,0 y 45,0 % y tiempos de incubación a 60; 90 y 120 min. La máxima producción de FOS 10,5 % la obtuvieron con sacarosa 30,0 %; a pH 5,0; 20 °C y 60 min de reacción³. Por el contrario, Pérez-Cruz *et al*⁷ produjeron 32,2 % de FOS, principalmente 1-kestosa utilizando *Pichia pastoris* inmovilizadas en alginato de calcio, en un biorreactor tipo tanque agitado de 5 L. A la vez, Ureta *et al*⁸ sintetizaron FOS utilizando sacarosa 20, 30 y 55 % (p/v) y Viscozyme L 3,5 %, de esta forma obtuvieron FOS 30 % de cadena corta (GF3 y GF4) con sacarosa 30 %⁸. En tanto, Vega *et al*⁹ utilizaron preparaciones enzimáticas comerciales, como Pectinex Ultra SP-L con 6 h de reacción, el rendimiento fue entre 58,8 a 62,6 % (g sc-FOS/100 g de sacarosa). En este aspecto, el extracto de algarrobo es un sustrato mucho más complejo en comparación a soluciones saturadas de sacarosa. Además, el seguimiento del bioproceso resultaba costoso, por ello se realizaron ensayos preliminares con diversas enzimas comerciales como inulina, invertasa y pectinasa con sacarosa al 30 %, y se encontraron rendimientos de 12,1 %, 11,5 %, y 14,0 % de glucosa, respectivamente. En estos experimentos se evaluaron las concentraciones de glucosa en el medio de reacción. La liberación de esta molécula fue directamente proporcional a la de síntesis de FOS.

En los últimos años, la demanda de FOS por las industrias alimentaria y farmacéutica se incrementó, por ello se busca convertir insumos alimentarios nativos con altas concentraciones de sacarosa a FOS utilizando procesos limpios y sostenibles como reacciones enzimáticas usando herramientas estadísticas para su optimización. Así, Vega *et al*¹⁰ analizaron temperatura, concentraciones de sacarosa y enzima (celulasas Rohapect CM) en el medio de reacción para la producción de FOS de cadena corta (sc-FOS). Las respuestas del diseño fueron las siguientes: rendimiento (g sc-FOS/100 g de sacarosa), 1-kestosa (g/100 g sc-FOS) y productividad volumétrica (g sc-FOS / L h). Las condiciones óptimas fueron 50 ° C, 6,6 U / ml de enzima, sacarosa 2,103 M en tampón de acetato 50 mM a pH 5,5, y 5 h. En estas condiciones, se lograron sGF2 de 68,2 %¹⁰. Por este lado, el método de superficie de respuesta con el diseño Box-Behnken disminuye los costos de cuantificación de FOS en el proceso, tanto por el método enzimático como por HPLC (tabla 1), los intermedios de las variables independientes fueron: 9,25 h, 55 °C, enzima 35,9 mg y extracto de algarrobo 35 °Bx.

Los porcentajes de FOS, glucosa libre y azúcares reductores de 15 de los 54 ensayos de transfructosilación se presentan en la tabla 2. En la matriz del MSR según el diseño Box-Benhen se observa que los porcentajes de glucosa tanto el menor (1,6 %) como el mayor (10,11 %) están en los ensayos N° 20 y 39, respectivamente, en las condiciones de 9,25 h, 55 °C, 17,5 µL de enzima y 35 °Bx de extracto de algarrobo. En todos los ensayos, la concentración de glucosa es directamente proporcional a la biosíntesis de fructooligosacáridos en el medio de reacción. Con respecto a la producción de FOS, fue menor en el ensayo N° 34 con 2,41 % y mayor en los ensayos N° 15, 26, 31, 39 y 41, en los que se alcanzó en los que se alcanzó una media de 13,81 % de FOS en el medio de reacción.

Tabla 2. Producción de FOS vía enzimática a partir del extracto de algarrobo según el diseño Box-Behnken del MSR.

N° ensayo	T (h)	TR (°C)	E (µl)	CS (°Bx)	G (%)	AR (%)	FOS (%)
1	9,25	45	17,5	20	4,66	8,94	11,01
2	18,00	55	5,0	35	8,99	13,15	11,26
3	9,25	65	17,5	50	6,82	17,45	11,45
4	9,25	65	17,5	20	4,29	7,87	12,75
5	18,00	55	17,5	50	8,06	14,02	9,56
6	9,25	45	17,5	50	5,19	17,28	12,99
7	18,00	45	17,5	35	8,33	14,87	12,98
8	18,00	45	17,5	35	8,40	14,56	13,04
9	9,25	55	5,0	50	8,43	15,78	12,09
10	18,00	55	17,5	50	8,55	14,11	8,70
11	9,25	45	5,0	35	9,30	12,33	9,91
12	9,25	55	5,0	50	8,89	15,97	12,70
13	9,25	45	30,0	35	7,19	13,49	7,07
14	9,25	45	30,0	35	7,56	13,84	7,34
15	9,25	55	17,5	35	9,45	16,03	13,88

Leyenda: T, tiempo; TR, temperatura de reacción; E, enzima; CS, concentración de sustrato o extracto de algarrobo; FOS, fructooligosacáridos; G, glucosa libre; AR, azúcares reductores libres; °Bx, grados Brix.

Al calcular el coeficiente de regresión de superficie del porcentaje FOS se encontró R^2 de 90,36 %, R^2 predictivo de 80,8 % y R^2 ajustado de 86,89 %. En tanto, el porcentaje de glucosa R^2 es 89,44 %, R^2 predictivo 79,08 % y R^2 ajustado 85,64 % (tablas 3 y 4). Los coeficientes de determinación R^2 señalan que la síntesis de FOS y glucosa libre se ajustan al modelo empleado. Las interacciones tiempo-enzima y temperatura-enzima en la biosíntesis de FOS presentaron un $p < 0,05$ (tablas 3 y 4), por lo que es estadísticamente significativo.

Tabla 3. Coeficiente de regresión de superficie de respuesta del porcentaje FOS vs. tiempo y temperatura.

EE del término	Coef.	Coef.	T	P
Constante	-55,9573	10,6026	-5,278	0,000
Tiempo (h)	1,3857	0,2360	5,872	0,000
Temperatura (°C)	1,8737	0,3205	5,846	0,000
Enzima (ul)	0,2142	0,1685	1,271	0,211
Algarrobo (°Bx)	0,4960	0,1514	3,277	0,002
Tiempo (h)*Tiempo (h)	-0,0430	0,0036	-11,838	0,000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	-0,0184	0,0028	-6,605	0,000
Enzima (ul)*Enzima (ul)	-0,0176	0,0018	-9,864	0,000
Algarrobo (°Bx)*Algarrobo (°Bx)	-0,0075	0,0012	-6,098	0,000
Tiempo (h)*Temperatura (°C)	-0,0007	0,0037	-0,195	0,846
Tiempo (h)*Enzima (ul)	-0,0159	0,0029	-5,422	0,000
Tiempo (h)*Algarrobo (°Bx)	-0,0008	0,0024	-0,319	0,751
Temperatura (°C)*Enzima (ul)	0,0082	0,0026	3,194	0,003
Temperatura (°C)*Algarrobo (°Bx)	-0,0002	0,0021	-0,076	0,940
Enzima (ul)*Algarrobo (°Bx)	0,0036	0,0017	2,103	0,042
S = 0.908322 PRESS = 64.1191				
R-cuad. = 90,36_% R-cuad.(pred.) = 80,78_% R-cuad.(ajustado) = 86,89_%				

La ecuación de segundo orden simula correctamente la síntesis de fructooligosacáridos de acuerdo al diseño Box-Behen.

$$Y = - 55,9573 + 1,3857X_1 + 1,8737X_2 + 0,2142X_3 + 0,4960X_4 - 0,0430X_1^2 - 0,0184X_2^2 - 0,0176X_3^2 - 0,0075X_4^2 - 0,0007X_1X_2 - 0,0159X_1X_3 - 0,0008X_1X_4 + 0,0082X_2X_3 - 0,0002X_2X_4 - 0,0036X_3X_4$$

Leyenda: Y, concentración de fructooligosacáridos; X1, tiempo en horas; X2, temperatura °C; X3, Concentración de enzima; X4, Concentración de extracto en °Bx.

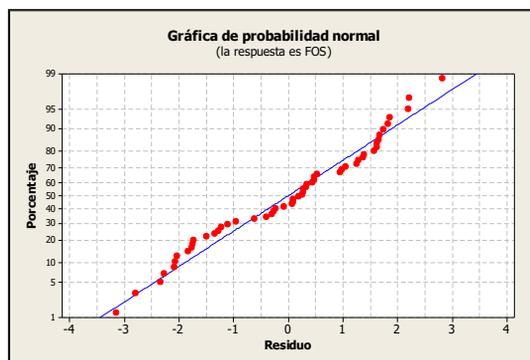


Figura 1. Gráfica de distribución normal de residuos del porcentaje de FOS.

Análisis gráfico de la producción de FOS. Los gráficos de superficie de respuesta y contorno (figuras 2 y 3) fueron establecidos entre dos factores, mientras los demás se mantuvieron en un nivel intermedio. Asimismo, la liberación de glucosa al medio fue directamente proporcional a la biosíntesis de FOS. Este resultado permitió monitorear el proceso de biosíntesis de FOS de forma indirecta usando un método enzimático fácil, rápido y económico.

El paquete estadístico Minitab 16 fue utilizado para generar gráficas de superficie y contorno usando las variables que influyen en el proceso de transfructosilación como tiempo (h), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), enzima (μL) y extracto de algarrobo ($^{\circ}\text{Bx}$) muestran los valores óptimos. Así, en la figura 2a se observa que el porcentaje más bajo de FOS (Z) se obtiene cuando la concentración de extracto de algarrobo (Y) es 20°Bx y enzima (X) $30 \mu\text{l}$ y el más alto a intervalos de 30 a 40°Bx y 15 a $20 \mu\text{l}$. Paralelamente, se observa en la figura 2b que el porcentaje más alto de glucosa se obtiene en un intervalo de tiempo y temperatura de 10 a 15 h y 54 a 60°C , respectivamente.

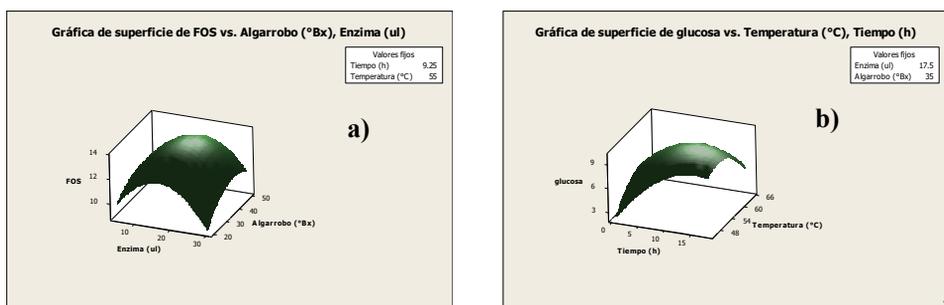


Figura 2. Gráficas de superficie de respuesta de los factores que afectan la producción de FOS a partir del extracto de algarrobo: a) porcentaje de FOS versus enzima y extracto de algarrobo; b) porcentaje de glucosa producida versus tiempo y temperatura.

La figura 3 muestra cómo el tiempo (T), la temperatura (TP), la concentración de enzima (CE) y el extracto de algarrobo (EA) afectan las reacciones de transfructosilación en la biosíntesis de FOS (Z). Las regiones más oscuras indican los valores con mayor producción de FOS, los niveles de contorno revelan un pico central en 12 h, 54 °C, 17.5 µl de enzima y 54 °Bx de extracto de algarrobo. En estas condiciones la producción de FOS (Z) fue ≥ 13 %.

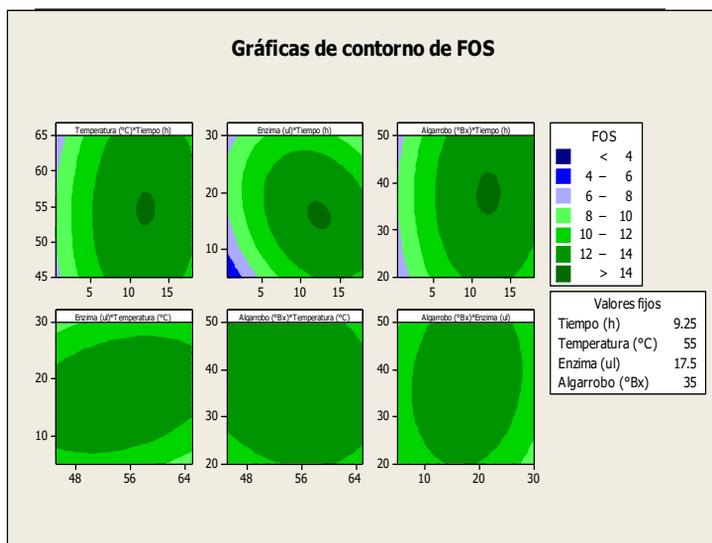


Figura 3. Gráficas de contornos del porcentaje de la producción de FOS versus tiempo, temperatura, enzima y extracto de algarrobo. a) temperatura y tiempo, b) enzima y tiempo, c) extracto y tiempo, d) enzima y temperatura, e) extracto y temperatura, f) extracto y enzima.

También se realizó la cuantificación de glucosa en el medio de reacción considerando la tabla matriz del diseño Box-Behnken, ya que la liberación de glucosa es concomitante tanto en las reacciones de hidrólisis como transfructosilación.

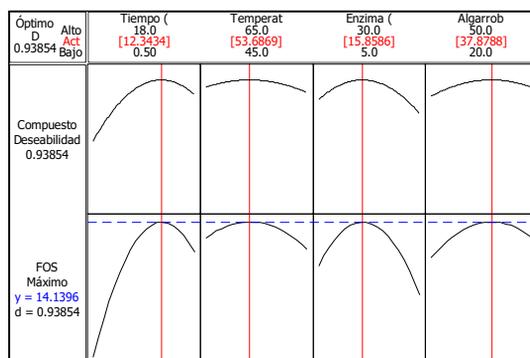
Tabla 4. Coeficiente de regresión de superficie de respuesta del porcentaje de glucosa vs tiempo y temperatura.

EE del término	Coef.	Coef.	T	P
Constante	-81,2627	10,2620	-7,919	0,000
Tiempo (h)	2,0408	0,2284	8,935	0,000
Temperatura (°C)	2,2975	0,3102	7,406	0,000
Enzima (ul)	0,3007	0,1631	1,844	0,073
Algarrobo (°Bx)	0,8144	0,1465	5,558	0,000
Tiempo (h)*Tiempo (h)	-0,0286	0,0035	-8,136	0,000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	-0,0207	0,0027	-7,675	0,000
Enzima (ul)*Enzima (ul)	-0,0018	0,0017	-1,030	0,309
Algarrobo (°Bx)*Algarrobo (°Bx)	-0,0098	0,0012	-8,206	0,000
Tiempo (h)*Temperatura (°C)	-0,0176	0,0036	-4,957	0,000
Tiempo (h)*Enzima (ul)	-0,0114	0,0028	-4,023	0,000
Tiempo (h)*Algarrobo (°Bx)	-0,0040	0,0024	-1,696	0,098
Temperatura (°C)*Enzima (ul)	0,0023	0,0025	0,911	0,368
Temperatura (°C)*Algarrobo (°Bx)	0,0018	0,0021	0,874	0,378
Enzima (ul)*Algarrobo (°Bx)	-0,0070	0,0017	-4,213	0,000
S = 0.879148 PRESS = 59.6796				

R-cuad. = 89,44 % R-cuad.(pred.) = 79,08 % R-cuad.(ajustado) = 85,64 %

El valor expresado por el coeficiente de determinación R^2 indicó que el 89,44 % de variabilidad en la respuesta se explica por el diseño propuesto.

Optimización de la respuesta. De acuerdo al análisis de respuesta del porcentaje de FOS, se determinaron los parámetros de optimización que se presentan en la figura 5 con el fin de maximizar las reacciones de transfructosilación, así como obtener el mayor porcentaje de FOS en el extracto de algarrobo.

**Figura 4.** Gráfica que indica las condiciones óptimas para el proceso de transfructosilación.

Validación del modelo para la producción de FOS. De acuerdo a los análisis y ajustes realizados se determinaron que las condiciones óptimas de producción de FOS a partir de azúcares simples son: 12 h; 54 °C; enzima 16 µl (31 mg) y extracto de algarrobo 38 °Bx, para un rendimiento teórico de 14 %, siendo el valor experimental 16,10 %. En estas condiciones se cuantificaron los carbohidratos presentes en el medio de reacción por HPLC (figura 4, tabla 5). En las muestras MP-EA0 (extracto de algarrobo crudo) y MP-EAD (extracto de algarrobo digerido) se obtuvieron 4,5 y 17,30 g de oligosacáridos totales, respectivamente, equivalentes a 16,10 g FOS por 100 g de extracto de algarrobo (tabla 5), siendo éste mayor a los reportados por Surín *et al*¹¹ quienes obtuvieron 14,36 % de FOS (nistosa (GF3) 2,03 % y kestosa (GF2) 12,33 %) a partir del jarabe de Logan. En tanto, Muñoz⁶, utilizando jugo de caña y células permeabilizadas de *Candida apicola*, obtuvo FOS 4,5%.^{6,11}

Tabla 5. Determinación de carbohidratos en los extractos de algarrobo mediante HPLC.

Muestra *(g/100g)	Fructosa* (%)	Glucosa* (%)	Sacarosa* (%)	Oligosacáridos (%)	
				FOS*	Otros
MP-EAO	8,00	7,40	18,10	0,00	4,50
MP-EAD	5,80	12,6	2,30	16,10	1,20

Leyenda: Donde: MP-EAO, Extracto de algarrobo inicial, MP-EAD; Extracto de algarrobo digerido.

En el cromatograma (figura 5) se muestran los tiempos de retención de FOS biosintetizado. Se observa la presencia de sc-FOS como kestosa (GF2), nistosa (GF3) y fructosilnistosa (GF4), con un mayor pico en GF2, lo cual sugiere la mayor concentración de este fructósido, similar a lo obtenido por Vega *et al*¹⁰ con sacarosa y Surin *et al*¹¹ con el jarabe de Logan^{10,1}.

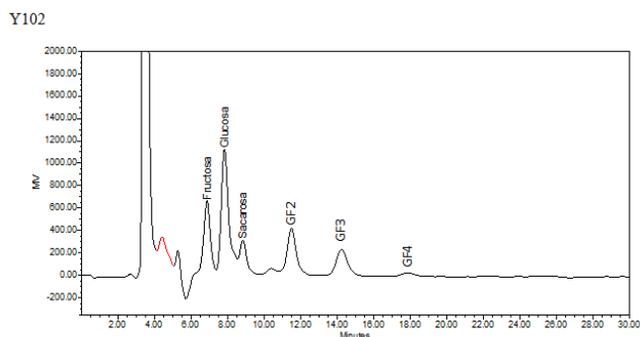


Figura 5. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC del extracto digerido de algarrobo.

La cuantificación de los diferentes polímeros de fructooligosacáridos producidos a partir del extracto de algarrobo por síntesis enzimática permitirá comparar mejor los resultados con los descritos por otros investigadores. Sin embargo, las condiciones óptimas de biosíntesis de FOS obtenidas en este estudio servirán para la prospección a nivel industrial y la valorización de un cultivo subutilizado para su uso como ingrediente alimentario saludable.

CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas para la producción de FOS 16.1 % a partir del extracto de algarrobo 38 °Bx fueron Pectinex Ultra SP-L 31,6 mg a 54 °C y 12 h 20 min. De este modo, el extracto de algarrobo se convierte en un ingrediente alimentario saludable alternativo elaborado con tecnología limpia y sostenible.

AGRADECIMIENTO

Este proyecto ha sido financiado por el VRI - UNMSM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tamayo L, Arteaga D y Jaramillo J. Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*) de interés para la industria de alimentos. Rev. Lasallista Investig. 2008; 5 (2):100-111
2. Flores-Maltos DA, Mussatto SI, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R, Teixeira JA, Aguilar CN. Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. Crit Rev Biotechnol. 2016;36(2):259-267.
3. Rubio C, Latina A, Antonio N. Producción de fructooligosacáridos por invertasa de *Aspergillus niger* Ib56: un prebiótico de importancia para la salud humana y animal. Bol Micol. 2012; 27: 18-23.
4. Pérez-Conesa D, López G, Ros G. Principales prebióticos y sus efectos en la alimentación. An. Vet. (Murcia). 2004; 20: 5-20
5. Sciammaro L, Ferrero C, Puppo C. Agregado de valor al fruto de *Prosopis alba*. Estudio de la composición química y nutricional para su aplicación en bocaditos dulces saludables. Rev Fac Agron. 2015; 114 (1): 115-123.
6. Muñoz Equihua E. Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con células permeabilizadas de *Candida apicola* [Tesis de Maestría]. Zapopan, Jalisco (México): Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco, A. C.; 2016.
7. Pérez-Cruz E, Martínez-García D, Sobrino-Legón A, Rodríguez-Rico A, Hernández L. Escalado de la reacción de biosíntesis de fructooligosacáridos, a partir de sacarosa, en biorreactores tipo tanque agitado. RTQ. 2011; 31(2): 19-25

8. Ureta MM, Romano N, Kakisu E, Gómez-Zavaglia A. Synthesis of fructooligosaccharides using grape must and sucrose as raw materials. *Food Res Int.* 2019; 123:166-171.
9. Vega-Paulino RJ, Zúñiga-Hansen ME. Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. *J Mol Catal B Enzym.* 2012; 76: 44-51.
10. Vega R. Zúñiga-Hansen ME. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. *Bioresour Technol.* 2011; 102(22):10180-10186.
11. Surin S, Seesuriyachan P, Thakeow P, Phimolsiripol Y. Optimization of enzymatic production of fructooligosaccharides from longan syrup. *J Appl Sci.* 2012; 12: 1118-1123.



**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 18 al 20 de octubre 2021**