

ISSN 1810-634X

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 86 N° 3

JULIO - SETIEMBRE - 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 Caveró, Hugo
Univ. Nac. de Ingeniería, Perú

La Rosa Toro Gómez, Adolfo
Universidad Nacional de Ingeniería

Areche Medina, Carlos
Universidad de Chile

Morales Bueno, Patricia
Pontificia Universidad Católica del Perú

Cedrón, Juan Carlos
Universidad De la Laguna – España

Ruiz Quiroz, Julio
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Flores del Pino, Lisveth
Universidad Nacional Agraria La Molina

Santiago Contreras, Julio
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Gamboa Fuentes, Nadia
Universidad Nacional Agraria La Molina

Sun Kou, Rosario
Pontificia Universidad Católica del Perú

Gómez Valdez, Badhin
Universidad Católica de Santa María

Valderrama Negrón, Ana
Universidad Nacional de Ingeniería

Kong, Maynard
Pontificia Universidad Católica del Perú

Vega Chacón, Juan
Universidad Nacional de Ingeniería

Ruiz Quiroz, Julio
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

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

JULIO - SETIEMBRE 2020

N° 3

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

CONTENIDO
(Vol. 86 – N° 3 – 2020)

Editorial	205
------------------------	-----

Trabajos Originales

- Actividad antioxidante y antimicrobiana del hidrolizado de gelatina de pieles de <i>Sarda chiliensis chiliensis</i> “bonito” por Tejada Periche Eder Eduardo, Fernández Jerí Yadira, Salazar Salvatierra María Elena.	207
- Análisis bioquímico de dos fracciones con acción anticoagulante de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> “chupasangre” por Mirtha Yarlequé, Miguel Zaldívar, Pablo Bonilla, Armando Yarlequé.	219
- Biosorción del colorante azul de metileno usando los cladodios de la tuna (<i>Opuntia ficus indica</i>) por Carmencita Lavado Meza, Rosario Sun Kou, Tracy Castro Arroyo.	231
- Caracterización físico química de los componentes volátiles del <i>Tecoma fulva</i> subsp. arequipensis (cahuato) por Jorge Chávez Fernández, Virginia Lizárraga Lazo, Eleana Vargas de Nieto.	246
- Distribución de arsénico en agua superficial y sedimento en la cuenca del río Carrizal, Manabí-Ecuador por Ana María Aveiga Ortiz, Patricio Javier Noles Aguilar, Fabián Peñarrieta Macías, Erika Murgueitio Herrera.	260
- Extracción y caracterización del alginato de sodio de la macroalga <i>Macrocystis pyrifera</i> por Yerald Ore B., E. Renzo Pichilingue L., Ana C. Valderrama Negrón.	276
- Gestión ambiental en la enseñanza de la química analítica por Elizabeth Norma Espinosa Descalzo	288
- Reúso en procesos de blanqueo textil de los efluentes provenientes de tinturas con colorantes reactivos negros de colorados mediante el método de Fenton por Carmen L. Uribe Valenzuela, Melissa J. Caballero Bustos, Percy O. Cárdenas Torres, Emilia G. Hermoza Guerra.	300
- Síntesis, caracterización y evaluación de la actividad biológica de compuestos de coordinación de cobalto con pirazinamida por Natalia Karolina Chávez Llallire, Rocío Isabel Ramírez Panti, Patricia Sheen Cortovarría, Mirko Juan Zimic Peralta, Ana Cecilia Valderrama Negrón.	315
- Variación estacional de la composición química del aceite esencial de las hojas de <i>Ophryosporus peruvianus</i> por Edith María Fernanda Mattos Vila, Ingrit Elida Collantes Díaz.	329

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 3 cm. 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

Visión y Perspectivas de la Química Teórica o Computacional

Dos hitos han marcado en los últimos 25 años el desarrollo de la química teórica o computacional, y es la obtención del tan ansiado premio Nobel, en el año 1998 por parte de Walter Kohn y John A. Pople, y más recientemente en el año 2013 por parte de Martin Karplus, Michael Levitt y Arieh Warshel. Esto aunado al vertiginoso desarrollo de la tecnología en el área de la computación, haciendo posible el uso de cada vez más potentes máquinas de supercómputo, o cómputo de alto desempeño, HPC por sus siglas en inglés.

Cuando se habla de la química teórica o computacional, suele considerarse en un espectro desde las aproximaciones clásicas como la mecánica molecular, pasando por métodos híbridos como Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular (QMMM), la mecánica cuántica, métodos relativistas y multi configuracionales para la astroquímica, entre otras. Todas estas áreas de desarrollo han sido impulsadas por lo expresado anteriormente (incremento de nuevas teorías y aproximaciones, así como el incremento en el poder de cálculo) que aún se vienen implementando en diversos campos, y que a su vez nos permiten la aplicación de métodos teóricos y computacionales a sistemas cada vez más grandes, cuando consideramos el número de partículas o átomos involucrados o en el número de funciones base y métodos utilizados.

En el contexto de la actual pandemia del SARS-CoV2, hemos podido asistir a la publicación de diversos estudios teóricos en revistas que eran eminentemente experimentales, o en revistas de muy alto impacto como Nature, Lancet, o Science, entre otras. Esto nos pone frente al reto de la reproducibilidad de las observaciones experimentales mediante el uso de aproximaciones teóricas, y retroalimentarse mutuamente para explicar la fenomenología observada por los investigadores en todo el mundo. Una tendencia que se viene incrementando, en el proceso de revisión de artículos, cuando se propone nuevos mecanismos de interacción, los revisores solicitan un respaldo de simulaciones, o en su defecto una explicación mediante teorías de reactividad química (que podían ser la Teoría de Reactividad de Parr-Pearson o la Teoría de Átomos en Moléculas).

En el contexto nacional, recordemos que el campo de la química teórica o computacional, es realmente naciente, debido a la necesidad de especialistas formados adecuadamente para que puedan generar nuevos centros de investigación con este tipo de líneas de investigación, porque podemos caer en el mero utilitarismo de ser usuarios de softwares, sin un adecuado uso y conocimiento de la teoría y sus aproximaciones, como ocurrió a inicios de este milenio a nivel internacional, por lo cual existió una fuerte discusión en los círculos científicos para diferenciar a los teóricos de los usuarios computacionales, decantándose por el uso indistinto, ya que los usuarios deberían ser adiestrados en conocimiento a fondo de la teoría, y es en este sentido que nuestra pequeña comunidad nacional de investigadores en el área de la química teórica o computacional debiera ahondar en el conocimiento profundo de las diversas teorías y sus aproximaciones matemáticas que son la fuente y base para las implementaciones

computacionales y generar resultados cada vez más cercanos a los datos experimentales, y que mediante herramientas como la termodinámica estadística podemos generalizarla adecuadamente al mundo macroscópico.

Por último, debemos estar conscientes de que al ser un área en la que la tecnología que se requiere no es muy costosa, en comparación con otras áreas de la química, podría ser un nicho adecuado para poder empezar a formar grupos de investigación que empiecen a aportar con nuevas publicaciones de circulación nacional e internacional y que puedan poner a nuestras universidades a la altura del concierto de los ránquines internacionales.

Dr. Badhin Gómez Valdez

Centro de Investigación en Ingeniería Molecular
Universidad Católica de Santa María

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DEL HIDROLIZADO DE GELATINA DE PIELES DE *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito”

Tejada Periche Eder Eduardo, Fernández Jerí Yadira*, Salazar Salvatierra María Elena

RESUMEN

Los residuos de la actividad pesquera contienen altas cantidades de colágeno y gelatina, que sometidos a procesos de hidrólisis enzimáticas podrían manifestar alguna actividad biológica. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana del hidrolizado de gelatina obtenido del colágeno de las pieles de *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito”. Para ello, la gelatina obtenida de las pieles de bonito se hidrolizó con la enzima alcalasa a diferentes condiciones de pH, temperatura, tiempo y relación enzima/sustrato. La actividad antioxidante *in vitro* de quince hidrolizados se evaluó mediante radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y radical catiónico 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS). La actividad antimicrobiana se evaluó mediante difusión en disco y microdilución en placa para la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los hidrolizados de gelatina de bonito presentaron grado de hidrólisis superiores a 10 %, con un máximo de 33,67 % y evidenciaron la IC50 para DPPH entre 0,459 y 1,830 mg/mL y para ABTS entre 0,075 y 0,200 mg/mL. El valor más bajo y el más alto de TEAC fue 61,76 y 165,38 μmol de trolox/g para los hidrolizados H7011 y H7012, respectivamente. Ocho hidrolizados (1000 $\mu\text{g/mL}$) presentaron efecto inhibitorio frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* con CMI igual o mayor a 500 $\mu\text{g/mL}$. Se puede concluir que los hidrolizados obtenidos mostraron actividad antioxidante y antimicrobiana para el modelo experimental aplicado.

Palabras clave: grado de hidrólisis, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante, *Sarda chiliensis chiliensis*.

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE HYDROLYZATE OF GELATIN SKIN FROM *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito”

ABSTRACT

Fishing activity residues contain high amounts of collagen and gelatin, which with enzymatic hydrolysis processes could manifest some biological activity. The present work aimed to determine the antioxidant and antimicrobial activities of gelatin hydrolysate obtained from *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito” skin collagen. For this, collagen protein fractions were hydrolyzed with alcalase enzyme at different conditions of pH, temperature, time and enzyme/substrate ratio. The in vitro antioxidant activity was evaluated for the fifteen hydrolysates obtained, by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil radical (DPPH) and cationic radical 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic (ABTS). The antimicrobial activity was evaluated by disk diffusion and broth microdilution for the minimum inhibitory concentration (MIC). Bonito gelatin hydrolysates indicated hydrolysis degree above 10 % with a maximum of 33.67 % and showed the IC₅₀ for DPPH between 0.459 and 1.830 mg/mL and for ABTS between 0.749 and 0.200 mg/mL. The lowest and highest TEAC value were 61.76 and 165.38 μmol of trolox/g for hydrolysates H7011 and H7012 respectively. Eight hydrolysates (1.0 mg/mL) presented inhibition halos against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, and equal or greater MIC than 500 μg/mL. It can be concluded that the obtained hydrolysates showed antioxidant and antimicrobial activities for the experimental model applied.

Key words: Degree of hydrolysis, antimicrobial activity, antioxidant, *Sarda chiliensis chiliensis*.

INTRODUCCIÓN

El bonito (*S. chiliensis chiliensis*) es una especie pelágica que se distribuye desde Puerto Pizarro hasta Tacna, considerado como uno de los principales recursos ictiológicos del Perú, y que en el 2019 tuvo como límite de captura anual 64 mil toneladas¹. La venta directa del bonito en los mercados de abasto genera subproductos como espinas, escamas, pieles entre otros que son desechados, produciendo de esta manera contaminación ambiental y desaprovechamiento de una importante fuente de proteínas que pueden ser empleadas en la producción de hidrolizados, con un valor agregado para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética².

La hidrólisis enzimática de los subproductos del pescado, es considerado un proceso ventajoso, controlado y selectivo, que genera péptidos de diferentes tamaños con propiedades funcionales o biológicas para el ser humano como antimicrobiano, antioxidante, antihipertensivo, entre otros³. Se han demostrado las actividades antioxidantes y antimicrobianas de péptidos

obtenidos a partir de hidrolizados enzimáticos, empleando como materia prima la gelatina y colágeno de los residuos de diferentes especies marinas^{2,4,5}.

Las propiedades funcionales de los hidrolizados dependen de la fuente de donde se obtenga, del grado de hidrólisis (GH), composición de los péptidos, enzima empleada y condiciones de reacción³, por lo que considerando estas propiedades y con la finalidad de proponer una aplicación alternativa al empleo de las pieles de bonito como sub productos de la actividad pesquera, se realizó la hidrólisis de la gelatina obtenida de dichas pieles empleando la enzima alcalasa y diferentes condiciones de temperatura, pH, tiempo y relación E/S, con el objetivo de obtener hidrolizados con actividad antioxidante y antimicrobiana así como demostrar el efecto del grado de hidrólisis (GH) sobre dichas actividades.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de las muestras: Se recolectaron como residuos de la actividad pesquera las pieles de *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito”, en el Terminal Pesquero de Ventanilla – Lima, durante el mes de diciembre del 2016. Se transportó en cooler y se almacenó a -20°C hasta su tratamiento.

Obtención de gelatina por hidrólisis parcial del colágeno: Se obtuvo colágeno por hidrólisis básica. Las pieles de pescado fueron tratadas con NaOH 0,5N, en la relación 1:10 (peso de piel: volumen) a 30 °C con agitación moderada por 10 horas. Para la obtención de gelatina, al colágeno se le agregó ácido acético (pH 5) y se llevó a baño termostatzado de 70°C por 6 h, se filtró y congeló a -20°C por 24 h, para luego descongelarse a temperatura ambiente y llevar a secado en circulación forzada de aire a 50°C por 12 h⁶.

Cuantificación de proteína total. La gelatina se cuantificó según el método de Bradford. Se realizó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) en el rango de concentraciones 250 - 750 µg/mL. Las lecturas fueron hechas a 595 nm.

Factores que influyen en el proceso de hidrólisis. Se realizaron 15 experimentos siguiendo el diseño factorial tipo Plackett-Burman con punto central por triplicado, para ello se empleó la enzima alcalasa de *Bacillus liqueniformis* (Sigma Aldrich) y como sustrato gelatina obtenida en el paso anterior (70,32 % de proteína). Las condiciones de reacción ensayadas fueron: pH (7, 8 y 9), temperatura (50, 60 y 70 °C), tiempo (2, 3 y 4 h) y relación [enzima]:[sustrato] ([1]:[20], [1]:[35] y [1]:[50]). Las condiciones de pH a ensayar se lograron empleando buffer fosfato pH7.0 y 8.00; y Buffer Tris-HCl pH 9.0 todos a concentración 10 mM. Se inactivó la enzima al final de cada reacción a temperatura de 90 °C por 10 minutos y se centrifugó a 3800 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Determinación del Grado de Hidrólisis (GH). Se realizó por cuantificación de proteína soluble por el método de Biuret, siguiendo el procedimiento descrito por Wangtueai *et al*⁷, se evaluó la proporción de proteína soluble en ácido tricloroacético (ATC) 20 % con respecto a

la cantidad total de proteína en las muestras. La curva de calibración se realizó con BSA y se calculó el GH con la siguiente fórmula:

$$GH = \frac{\text{Proteína soluble en solución de ATC (mg)}}{\text{Proteína total en la muestra no hidrolizada (mg)}} \times 100\%$$

Actividad antioxidante mediante el método del radical (DPPH). Se empleó el método modificado por Brand-Williams W. *et al*⁸. Para lo cual 980 μL del reactivo 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH® Sigma Aldrich) se mezcló con 20 μL de hidrolizado a diferentes concentraciones (25 a 2750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se dejó reaccionar por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad, la densidad óptica se leyó en un espectrofotómetro Agilent Cary 8454 a 517 nm. Se emplearon como estándares vitamina C y Trolox a concentraciones entre 0,8 – 2,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1,2 – 6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Actividad antioxidante mediante el método del radical catiónico (ABTS). Se empleó la metodología propuesta por Re R. *et al*⁹. Para lo cual 50 μL del hidrolizado diluido se mezcló con 950 μL del reactivo ABTS y se incubaron a 30°C por 30 min. Las lecturas se midieron en espectrofotómetro a 734 nm. Los hidrolizados se diluyeron a concentraciones de 15 a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se empleó como estándar el reactivo Trolox a las concentraciones de 2,5 - 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$. los resultados se expresaron como micromoles de equivalentes Trolox por gramo de proteína ($\mu\text{molET}/\text{g}$).

Actividad antimicrobiana. Se utilizó el método difusión en pozo en agar descrito por Rojas *et al*¹⁰. Para ello se prepararon suspensiones de turbidez 0,5 de la escala de McFarland de cultivos de 24 h de las cepas clínicas *Stahylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, y se inocularon en Agar Muller Hinton para bacterias y Agar Dextrosa Saboraud para la levadura, a razón de 1 mL por cada 100 mL de medio. Se homogenizó y distribuyó 25 mL en cada placa petri estéril (90 mm) y se dejó solidificar. Luego se realizaron pozos de diámetro externo 9 mm y en cada pozo se incorporó 100 μL de hidrolizado (1,0 y 0,5 mg/mL). Se dejó difundir por 1 h y se llevó a 37 °C por 24 h. Se midieron los halos de inhibición (mm.) indicativo de las propiedades antimicrobianas de las muestras analizadas.

Método de microdilución colorimétrica. Se trabajó según las metodologías del CLSI y Sarker *et al*^{11,12}, para ello en una microplaca de 96 pocillos se agregaron cantidades iguales de concentraciones geoméricamente ascendentes de la muestra, suspensión del microorganismo 1- 1,5x10⁸ ufc/mL (0,5 escala de McFarland) en caldo Muller Hinton y resazurina (20 mg/mL) como indicador de crecimiento bacteriano. Se incubó a 37 °C por 16-20 h y el crecimiento microbiano se evidenció por cambio de coloración de azul púrpura a rosado rojizo en comparación con el control. La menor concentración de hidrolizado a la que no se observó viraje de color de púrpura a rosado se consideró como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Análisis estadístico. La significancia de los factores que influyeron en el proceso hidrolítico se realizó mediante el diseño factorial tipo Plackett-Burman con punto central por triplicado y nivel de significancia de $p < 0,05$, empleando el software estadístico Minitab ® v. 17.1.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de los factores que influyen en el proceso de hidrólisis

La hidrólisis enzimática a las diferentes condiciones de pH, temperatura, tiempo y relación [enzima/sustrato] expresada como porcentaje de grado de hidrólisis (GH) se muestra en la tabla 1. El menor GH (11,24 %), se observa para el tratamiento H505 bajo las condiciones de 50°C, pH 9, tiempo de 2 h y relación enzima/sustrato [1/20] y el máximo GH se reportó en el punto central en las 3 repeticiones para los experimentos H601, H602 y H603 con 33,21 %; 32,67 % y 33,04 %, respectivamente, a las condiciones de 60°C, pH 8, tiempo de 3 horas y relación enzima/sustrato [1/35]. Estudios similares se han realizado empleando la enzima alcalasa, al respecto Blanco *et al*², reportaron GH menores al 20 % para los hidrolizados del colágeno extraído de la piel de las especies de tiburón moteado, tiburón azul, pez espada y atún aleta amarilla a condiciones 50°C, pH 8, [enzima]: [sustrato] equivalente a [1]:[20] y tiempo de 3 h. Asimismo, Jridi *et al*¹³ sometieron a hidrólisis enzimática la gelatina de piel de sepia (*Sepia officinalis*), alcanzando un GH de 20,3 % empleando la enzima alcalasa a pH 8 y por un tiempo de 3 h.

Todos los hidrolizados de gelatina ensayados presentaron GH superiores a 10 %, por lo que son considerados en el grupo de alto grado de hidrólisis, y podrían mejorar las características de solubilidad y digestibilidad del mismo, si bien es cierto en la presente investigación no se realizaron pruebas funcionales a los hidrolizados, se conoce que hidrolizados de sub productos de pescado y pescado entero con GH mayores a 10 % incrementan la absorción de agua, solubilidad y capacidad espumante, además mejoran sus características sensoriales, importante para fines de la industria alimentaria^{14,15}.

El GH es considerado un indicador importante en un proceso hidrolítico, como resultado de este, se obtienen cadenas peptídicas de diferente tamaño o aminoácidos libres que pueden relacionarse con las propiedades funcionales.

Tabla 1. Efecto de los factores pH, temperatura, tiempo y relación [enzima/sustrato] en el grado de hidrólisis por tratamiento.

CONDICIONES MUESTRA	ALCALASA				GRADO DE HIDRÓLISIS
	Temperatura (°C)	pH	Tiempo de hidrólisis (h)	Relación [enzima:sustrato] [w:w]	(%)
H601	60	8	3	[1/35]	33,21
H602	60	8	3	[1/35]	32,67
H603	60	8	3	[1/35]	33,04
H504	50	7	2	[1/50]	16,42
H505	50	9	2	[1/20]	11,24
H506	50	9	4	[1/50]	15,31
H507	50	9	4	[1/20]	11,99
H508	50	7	2	[1/20]	13,24
H509	50	7	4	[1/50]	25,80
H7010	70	7	4	[1/50]	16,29
H7011	70	9	2	[1/50]	16,96
H7012	70	7	2	[1/20]	11,49
H7013	70	9	4	[1/20]	17,17
H7014	70	7	4	[1/20]	16,67
H7015	70	9	2	[1/50]	20,99

Los resultados de la presente investigación bajo diferentes tratamientos demuestran que el GH depende de los diferentes factores estudiados, siendo la relación enzima/sustrato la variable que influencia significativamente en la hidrólisis enzimática de la gelatina de bonito (p valor $< 0,05$), como se presenta en la figura 1.

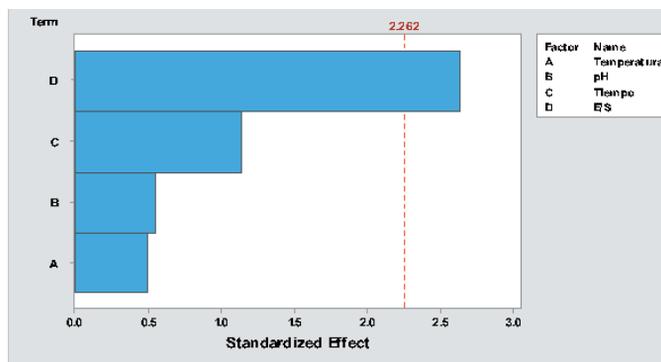


Figura 1. Diagrama de Pareto de los Factores Temperatura (valor-p: 0,635), pH (valor-p: 0,595), Tiempo (valor-p: 0,285) y relación Enzima / sustrato [E/S] (valor-p: 0,027*) en la hidrólisis enzimática de la gelatina de *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito”.

Es importante notar que las variables tiempo y temperatura no influyen significativamente en el proceso de hidrólisis propuesto por lo que se puede aprovechar esta información, a fin de reducir a los mínimos valores de estos factores en un proceso de optimización, para reducir costos.

Relación entre la actividad antioxidante y el GH

En la tabla 2 se presenta la actividad antioxidante expresada como porcentaje de inhibición del radical DPPH, ABTS, así como también el IC50 y TEAC correspondiente a cada tratamiento.

Tabla 2. Grado de hidrólisis (% GH) y actividad antioxidante por los métodos DPPH● y ABTS ●+ para cada muestra.

Muestra	Grado de hidrólisis (%)	Actividad Antioxidante		
		(DPPH●)		(ABTS●+)
		IC50 mg/mL	IC50 mg/mL	TEAC (μmol Trolox/g hidrolizado proteico)
Vitamina C	–	0,00168	–	–
Trolox	–	0,00353	–	–
H601	33,21	1,240	0,139	89,28
H602	32,67	1,237	0,136	91,21
H603	33,04	1,247	0,137	90,67
H504	16,22	0,539	0,097	128,32
H505	11,24	1,827	0,161	79,45
H506	15,31	1,611	0,160	77,48
H507	11,99	1,702	0,162	76,22
H508	13,24	0,533	0,086	143,79
H509	25,80	0,959	0,114	109,08
H7010	16,59	1,226	0,135	91,74
H7011	16,96	1,830	0,200	61,76
H7012	11,49	0,459	0,075	165,38
H7013	17,17	1,706	0,172	72,12
H7014	16,67	1,006	0,122	101,33
H7015	20,99	1,393	0,114	108,92

Los valores de IC50 por el método DPPH se encontraron entre 0,459 (H7012) y 1,830 mg/mL (H7011) y por el método ABTS variaron entre 0,075(H7012) y 0,200 mg/mL (H7011), siendo la mejor actividad antioxidante la que presenta valores de IC50 menores, en este caso corresponde al hidrolizado H7012 seguido de H504 y H508, además los valores de TEAC más altos se reportan también para estos 3 hidrolizados. Los resultados se asemejan a los reportados por otros autores. Wang *et al*¹⁶ encontraron buenas actividades antioxidantes de tres péptidos del hidrolizado del colágeno obtenido de escamas de *Pseudosciaena crocea* determinadas por el método DPPH (IC50 1,271; 0,675 y 0,283 mg/mL) y ABTS (IC50 0,421; 0,309 y 0,210 mg/mL), por otro lado Weng *et al*¹⁷ determinaron la actividad antioxidante de diferentes hidrolizados de piel de tiburón obteniendo para una de sus fracciones IC50 (DPPH) de 0,57 mg/mL similar a Nakchum *et al*¹⁸ que obtuvieron 0,417 mg/mL, para una fracción de hidrolizado de colágeno, aplicando el mismo método.

Se puede observar que las actividades antioxidantes del presente estudio no guardan relación directa con el GH, las mejores actividades antioxidantes para H7012, H504 y H508 se obtuvieron a GH de 11,49 %, 16,42 % y 13,24 %, observando que por encima de 16 % la actividad antioxidante fue menor, lo cual concuerda con diversos estudios que han demostrado actividad antioxidante tanto de hidrolizados como de sus fracciones peptídicas empleando la enzima alcalasa con GH menores al 20 %^{4,5,13,16,17,18}.

Los IC 50 obtenidos en el estudio, demuestran una buena actividad antioxidante, no se realizó el fraccionamiento, porque uno de los potenciales usos es el empleo de hidrolizados directamente en la industria de alimentos³ y los hidrolizados H7012, H504 y H508, podrían ser empleados para estos fines. Son pocos los estudios que comparan la actividad del hidrolizado sin fraccionar, como es el estudio de Jridi *et al*¹³, quienes compararon la actividad antioxidante de cuatro hidrolizados de gelatina de la piel de sepia obtenidos con tres enzimas crudas de diferentes microorganismos y una comercial (alcalasa), demostrando una mayor actividad antioxidante para el hidrolizado con alcalasa sugiriendo que los péptidos de los diferentes hidrolizados podrían ser diferentes en términos de longitud de cadena y secuencia de aminoácidos. Por otro lado Blanco *et al*², al comparar la actividad antioxidante con los métodos de DPPH y ABTS de cuatro hidrolizados de colágeno obtenido de la piel de cuatro especies diferentes, demostraron que dicha actividad no solo está influenciada por el GH, sino también por la presencia de aminoácidos como la cisteína que interactúa con los radicales libres por sus grupos SH libres. La atribución de la buena actividad antioxidante de los hidrolizados de residuos de pescado y sus residuos podría estar asociada a la presencia de aminoácidos aromáticos y la capacidad de los grupos fenólicos como donadores de protones. Aunque, podría también relacionarse con la conformación y abundancia de los péptidos, así como a la posición de aminoácidos dentro de las secuencias peptídicas^{2,5,13}

Relación entre la actividad antimicrobiana y el GH

La actividad antimicrobiana de los diferentes hidrolizados fue evidenciada por la presencia de halos sólo frente a *S. aureus* y *B. subtilis*, como se muestra en la tabla 3 y se complementó la evaluación con la determinación de la CMI

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los hidrolizados utilizando difusión en agar y microdilución.

Muestra	Halos de inhibición (mm) para la concentración de 1 mg/mL de cada muestra		CMI (µg/mL)	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
H601	15,5	14,5	> 1000	1000
H602	15,0	14,0	> 1000	1000
H603	15,5	14,0	> 1000	1000
H504	13,5	13,5	500	500
H505	-	-	-	-
H506	-	-	-	-
H507	-	-	-	-
H508	14,0	-	1000	1000
H509	13,0	13,5	1000	1000
H7010	14,0	-	1000	1000
H7011	-	-	-	-
H7012	-	-	-	-
H7013	-	-	-	-
H7014	14,5	13,5	1000	>1000
H7015	-	-	-	-

Los hidrolizados H601, H602, H603, H504, H508, H509, H7010 y H7014 mostraron actividad antimicrobiana baja frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* con halos entre 13 a 15,5 mm; sin embargo superan a lo obtenido por Gómez-Guillén *et al*⁴ quienes reportan para el hidrolizado de piel de atún, halos de inhibición de aproximadamente 7,5 mm (con discos de 5 mm) frente a *Staphylococcus aureus*; así también Vinoth L¹⁹, demostró actividad antimicrobiana en hidrolizados de piel y músculo de quince pescados, destacando el del pez globo *Arothron stellatus* que presentó halo de 9 mm para *S. aureus* y 6 mm frente a *Escherichia coli*.

También a los hidrolizados se les determinó la CMI mediante el método de microdilución colorimétrica, hallando que la mayoría presentó CMI igual a 1000 µg/mL, que indicaría una actividad baja, o sin actividad en casos de CMI mayores a 1000 µg/mL; sin embargo, el hidrolizado H504 con GH de 16,22 % mostró CMI de 500 µg/mL frente a *S. aureus* y *B. subtilis*. Los valores entre 500 - 1000 µg/mL que indicarían baja actividad; estarían posiblemente asociadas a las características propias de los componentes (péptidos, aminoácidos, proteínas no hidrolizadas, entre otros) de los hidrolizados, como la solubilidad, peso molecular, polaridad, estructura y composición; y que a la vez podrían interaccionar no sólo con el microorganismo sino también con el medio de cultivo³. Sin embargo, considerando que estos hidrolizados derivan sólo de proteínas y no tienen otro tipo de componente; podríamos afirmar que lo obtenido no es despreciable por lo que se recomienda continuar con la purificación de los péptidos a fin de obtener mejores actividades.

CONCLUSIONES

Según los resultados las condiciones de reacción enzimática empleando la enzima alcalasa influyen en el grado de hidrólisis, llegando a obtener hidrolizados de 33,65 % a las condiciones de 60°C, pH 8, tiempo de 3 h y relación enzima/sustrato [1/35], siendo la relación E/S la variable que influye significativamente en el proceso de hidrólisis. Sin embargo, las mayores actividades antioxidantes y antimicrobianas se presentaron a GH entre 13 y 17 %. Tres hidrolizados H504, H508 y H7012 presentaron buena actividad antioxidante con valores de TEAC de 128,32; 143,79; 165,38 mol Trolox/g hidrolizado proteico. Ocho hidrolizados presentaron actividad antimicrobiana baja frente a *Staphylococcus aureus* (13 -15.5 mm) y *Bacillus subtilis* (13 - 14,5 mm), el hidrolizado H504 mostró CMI de 500 µg/mL frente a *S. aureus* y *B. subtilis*. En base a los resultados de la presente investigación la gelatina obtenida de la piel de *Sarda chiliensis chiliensis* puede ser empleada en un proceso controlado para obtener hidrolizados con propiedades funcionales y actividad antioxidante y antimicrobiana que pueden ser aprovechados por la industria de alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. R.M. N° 003-2019-PRODUCE. 7 de enero 2019. Establecen el límite de captura del recurso bonito para el período 2019. Publicado en El Peruano. Martes 8 de enero del 2019.
2. Blanco M, Vásquez J, Pérez-Martín R, Sotelo C. Hydrolysates of fish skin collagen: an opportunity for valorizing fish industry byproducts. *Mar Drugs*. 2017; 15 (5): 131-145.
3. Hleap J, Gutiérrez C. Hidrolizados de pescado - producción, beneficios y nuevos avances en la industria. -Una revisión. *Acta Agron*. 2017; 66 (3): 311-322.
4. Gómez-Guillén MC, López-Caballero M, Alemán A, López de Lacey A, Giménez B, Montero P. Sea by-products as Real Material: New ways of Application. 1ra ed. Kerala, India: Transworld Research Network; 2010; 7.
5. Chi CF, Cao ZH, Wang B, Hu FY, Li ZR, Zhang B. Antioxidant and Functional Properties of Collagen Hydrolysates from Spanish Mackerel Skin as Influenced by Average Molecular Weight. *Molecules*. 2014; 19 (8): 11211-11230.
6. Thi Hue C, Hang NT, Razumovskaya R. Physicochemical characterization of gelatin extracted from european perch (*Perca fluviatilis*) and Volga pikeperch (*Sander volgensis*) skins. *Turk J Fish Aquat Sci*. 2017; 17: 1117-1125.
7. Wangtueai S, Siebenhandl-Ehn S, Haltrich D. Optimization of the preparation of gelatin hydrolysates with antioxidative activity from Lizardfish (*Saurida* spp.) Scales Gelatin. *Chiang Mai J Sci*. 2016; 43 (1): 68-79.
8. Brand-William W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*. 1995; 28: 25-30.
9. Re R, Pekkegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved Abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999; 26(9): 1231-1237.
10. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2003; 88(2): 199-204.
11. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility. Tests for bacteria that grow aerobically; approved Standard. 10th Ed. Vol 32, CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
12. Rojas J, Ruiz J, Almonacid R, Ortiz J, Palomino M, Huaroto L, et al. Antibacterial activities of essential oils from three medicinal plants in combination with EDTA against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Br Microbiol Res J*. 2016; 17(4): 1-10
13. Jridi M, Lassoued I, Nasri R, Ayadi MA, Nasri M, Souissi N. Characterization and Potential Use of Cuttlefish Skin Gelatin Hydrolysates Prepared by Different Microbial Proteases. *BioMed Res Int*. 2014; 1-14.
14. Llerena T, Rodríguez W. Obtención y caracterización de un hidrolizado de colágeno purificado producido mediante el uso de la enzima delvolase. *Anales Científicos*. 2017; 78 (2): 251 – 259.
15. León-López A, Morales-Peñaloza A, Martínez-Juárez VM, Vargas-Torres A, Zeugolis DI, Aguirre-Álvarez G. Hydrolyzed Collagen-Sources and Applications. *Molecules*. 2019 Nov 7; 24(22):4031. doi: 10.3390/molecules24224031.

16. Wang B, Wang YM, Chi CF, Luo HY, Deng SG, Ma JY. Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (*Pseudosciaena cricea*). *Mar Drugs*. 2013; 11 (11): 4641-4661.
17. Weng W, Tang L, Wang B, Chen J, Su W, Osako K, et al. Antioxidant properties of fractions isolated from blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin hydrolysates. *J Funct Foods*. 2014; 11: 342-351.
18. Nakchum L, Kim SM. Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent. *Prep Biochem Biotech*. 2016; 46 (2): 123-130.
19. Vinoth Kumar L. Antimicrobial activity of biopeptides extracted from fish protein hydrolysate. [Tesis de Maestría]. Thoothukudi, India: Tamilnadu Veterinary and Animal Science University; 2013.

ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE DOS FRACCIONES CON ACCIÓN ANTICOAGULANTE DE LAS HOJAS DE *Oenothera rosea* “CHUPASANGRE”

Mirtha Yarlequé^a, Miguel Zaldívar^a, Pablo Bonilla^b, Armando Yarlequé^c

RESUMEN

Tradicionalmente las hojas de *Oenothera rosea* “chupasangre” son usadas para reducir los hematomas, por lo que, esta investigación estuvo dirigida a la evaluación de los componentes capaces de retardar la coagulación sanguínea. Del extracto etanólico de *O. rosea* se separó por cromatografía de capa fina en celulosa, usando etanol: agua (1:5), dos fracciones F-2 y F-5, que luego fueron preincubadas por 10 minutos con trombina y el veneno de la serpiente *Lachesis muta*, rico en Enzima Semejante a Trombina (EST) y luego se midió la actividad coagulante sobre plasma humano citratado y fibrinógeno bovino (Fb), así como el sustrato cromogénico BApNA. Los resultados mostraron que F-2 alargó el tiempo de coagulación sobre Fb en 58,58 % y el F-5 en 67,78 %, mientras que usando veneno los retardos fueron para F-2 10,67 % y F-5 36,27 %. Usando plasma, los valores fueron para F-2 34,14 % y F-5 70,59 %. Asimismo, empleando trombina la actividad amidolítica se redujo en F-2 48,48 % y F-5 67,32 %, mientras que con la EST de *L. muta* la inhibición de F-2 50,20 % y F-5 69,10%. Mediante estos ensayos *in vitro* se concluye que F-2 y F-5 podrían ser flavonoides anticoagulantes, con probable acción antitrombótica.

Palabras clave: coagulación, flavonoides glicosilados, plasma, trombina, fibrinógeno, veneno.

^a Laboratorio de Bioquímica y Principios Activos Naturales, Facultad de Medicina Hipólito Unanue, UNFV. Jr. Río Chepén 290, El Agustino. Lima, Perú. *E-mail: bioyarleque@gmail.com

^b Laboratorio del Instituto de Investigación de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM. Jr. Puno N°1002. Lima, Perú.

^c Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM. Ciudad Universitaria - Cercado de Lima. Lima, Perú.

BIOCHEMICAL ANALYSIS OF TWO FRACTIONS WITH ANTICOAGULANT ACTION OF THE LEAVES OF *Oenothera rosea* "CHUPASANGRE"

ABSTRACT

Traditionally the leaves of *Oenothera rosea* "chupasangre" are used to reduce the bruising in humans. Therefore, this research was focused at evaluating of the fractions capable of retarding blood clotting. From the ethanolic extract of *O. rosea* separated by thin layer chromatography on cellulose using ethanol: water (1: 5), F-2 and F-5, which were preincubated for 10 minutes with thrombin and the venom of the *Lachesis muta* snake rich in EST (Thrombin-like enzyme) and then coagulant activity was measured on citrated human plasma and bovine fibrinogen, as well as the BApNA chromogenic substrate. The results showed that F-2 lengthened the clotting time over Fb 58,58 % and F-5 67,78 %, while using poison the delays were for F-2 10,67 % and F-5 36,27 %. Using plasma, the values were for F-2 34,14 % and F-5 70,59 %. Likewise, by using thrombin the amidolytic activity was reduced by F-2 48,48 % and F-5 67,32 % while with the EST of *L. muta* the inhibition of F-2 50,20 % and F-5 69, 10%. These in vitro tests conclude that F-2 and F-5 will be anticoagulant flavonoids with probable antithrombotic action.

Key words: coagulation, glycosylated flavonoids, plasma, thrombin, fibrinogen, venom.

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas de salud de mayor importancia para el ser humano está relacionado con la obstrucción parcial o total del sistema circulatorio por aparición de trombos (trombosis). Esto se debe a la formación inusitada de coágulos de fibrina, a partir de fibrinógeno circulante, al activarse la cascada de coagulación. En este sentido, la exploración de diferentes componentes, especialmente de origen vegetal, es una labor continua¹.

La especie *Oenothera rosea* Aiton, es una planta herbácea que se encuentra distribuida desde el suroeste de Estados Unidos, México hasta Argentina, pasando por Perú y Bolivia. Esta planta crece desde los 600 a 3900 m.s.n.m. y es conocida popularmente como "chupasangre", "sanguinaria", "hierba del golpe" y "yawar socco", ya que se utiliza tradicionalmente para resolver los hematomas o como cicatrizante, antiinflamatorio y para atender problemas gastrointestinales^{2,3,4}.

Algunos de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de *O. rosea* han sido ensayados en sus efectos antiinflamatorios, cicatrizantes, antioxidantes, antiagregantes plaquetarios y más recientemente en su acción anticoagulante; sin embargo, no han sido reportados

los compuestos responsables de dichos efectos^{4,5,6}. En el año 2007, se ensayó la actividad anticoagulante del extracto etanólico/acuoso de *O. rosea*, “chupasangre”, sobre el plasma humano citratado y en los últimos años se han realizado investigaciones sobre algunas de las fracciones acuosas separadas, evaluando su capacidad anticoagulante³.

En el año 2015, aislaron flavonoides del extracto metanólico y acuoso de *Lanularia racemosa* mostrando su efecto inhibitorio sobre la trombina, además, se reportó que la quercetina y sus derivados glicosilados, tienen la capacidad de interactuar a nivel del centro activo de la trombina por bloqueo a nivel del aminoácido serina⁷. Asimismo, los flavonoides quercetina y silibina inhiben el factor X activado de la coagulación (Xa), a nivel de la Ser 195, reduciendo también la actividad amidolítica sobre el sustrato cromogénico BApNA^{1,8}.

Recientemente, han reportado ensayos con 42 flavonoides para evaluar el efecto sobre la trombina, utilizando el sustrato cromogénico S-2238; sus resultados indican que algunos flavonoides mostraron fuerte efecto inhibitorio, IC₅₀, con valores desde 56,50 μM a 99,70 μM, estos son miricetina, scutellareína, isorhamnetina, miricitrina, baicalina, apigenina e hidroxigenkwanina⁹.

Por tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto anticoagulante de dos fracciones aisladas de *O. rosea*, usando como sustratos el Plasma Humano Citratado (PHC) y Fibrinógeno de Bovino (Fb), con el fin de contribuir a los esfuerzos científicos en la búsqueda de nuevas herramientas moleculares para contrarrestar las alteraciones cardiovasculares que afectan al ser humano^{7,8,9}.

PARTE EXPERIMENTAL

Muestras de *Oenothera rosea*

Las muestras de *Oenothera rosea* Aiton fueron recolectadas en el distrito de Matucana, provincia de Huarochirí departamento de Lima, a 2378 m.s.n.m., en el periodo de octubre 2015 a febrero 2016. La planta completa fue colocada en una prensa para lograr su herborización y posterior identificación taxonómica en el Museo de Historia Natural UNMSM.

Se realizó la separación de las hojas, las cuales fueron colocadas en un lugar fresco y ventilado para que se sequen completamente para luego ser pulverizadas (300 g) y colocadas en un frasco oscuro agregándole etanol de 960 (1 L) y se guardó en un lugar oscuro para su maceración por 7 días. Luego, el extracto fue filtrado en un matraz, utilizando papel Whatman No 4. Posteriormente se realizó la evaporación del solvente utilizando una estufa a 40 °C, hasta su secado total. Para realizar las pruebas se pesaron cantidades variables del extracto seco, haciendo disoluciones con agua destilada. La parte soluble en agua se filtró con papel Whatman No1 y se evaporó en una estufa a 40 °C, obteniéndose la fase acuosa (Fa) con la que se trabajó.

Veneno de serpiente

El veneno liofilizado de la serpiente *Lachesis muta* fue proporcionado por el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, a partir de especímenes mantenidas en cautiverio en el Serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural de esa institución. Se consideró que 1mg/mL de veneno liofilizado de *L. muta* contiene 1,62 mg/mL de proteína, leído a 280 nm¹⁰.

Marcha fitoquímica

Se utilizó el extracto etanólico seco de hojas de *O. rosea* para obtener la fase acuosa (Fa) y realizar las reacciones cualitativas que permitieron evaluar la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, taninos saponinas y carbohidratos; por medio de reacciones de color, de precipitación y formación de espuma¹¹.

Cromatografía en capa fina

Se realizó la cromatografía en capa fina, usando como fase estacionaria cromatofolios de celulosa y como fase móvil etanol: agua (1:5). Se realizó la siembra con una solución de 500 mg/mL de la Fa utilizando capilares nuevos. Los reveladores utilizados fueron: tricloruro férrico al 1 % y luz UV 365 nm. El número de las fracciones obtenidas mediante este método fueron siete que se identificaron cualitativamente por fluorescencia. Las fracciones F-2 y F-5 fueron seleccionadas para los ensayos de la actividad anticoagulante, pues fueron capaces de retardar el tiempo de coagulación del plasma humano citratado.

Cuantificación de flavonoides

Los flavonoides totales fueron determinados por el método desarrollado por Zhishen *et al.* Se preparó un tubo que contenía 0,250 mL de la muestra que fue mezclada con 1 mL de agua destilada, se añadió 0,075 mL de NaNO₂ y se dejó reposar por 5 minutos, luego se agregó 0,075 mL de AlCl₃ al 10 % y 0,5 mL de NaOH 1 M¹². La mezcla fue centrifugada a 3500 r.p.m. durante 5 minutos. Las absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro UV-Vis Génesis 10 a 510 nm. Se preparó la curva de calibración utilizando Rutina como flavonoide estándar, a concentraciones 10 ug a 100 ug/mL.

Actividad enzimática: Actividad coagulante

Se realizó utilizando como sustratos plasma humano citratado y fibrinógeno bovino Sigma Chem. (5 mg/mL), y como enzimas la trombina bovina liofilizada (Tb) de la marca Sigma Aldrich y la EST presente en el veneno de *L. muta*. Se preparó la Tb a una concentración de 1U /mL (0,020 mg/mL), en solución de cloruro de sodio 0,85% y el veneno de serpiente fue preparado a una concentración inicial de 1 mg/ mL¹⁰.

El plasma humano se obtuvo de donantes voluntarios de 20 a 30 años que no presentaban problemas hematológicos. Se extrajo 9 mL de sangre venosa y mezcló con 1 mL de citrato de sodio 3,8 % (9:1), se centrifugó a 3 500 rpm durante 10 minutos para separar el plasma del paquete globular. El fibrinógeno bovino comercial fue preparado a una concentración de 5 mg/mL en buffer Tris HCl 0,05M pH 7,4 a 37 °C.

Para medir la actividad coagulante se preincubó 0,2 mL del sustrato y 0,1 mL de Buffer Tris a 37 °C, adicionándose luego 0,1 mL de veneno o trombina comercial. Con la ayuda de un cronómetro se midió el tiempo de coagulación en segundos. Para la medición de la actividad específica, se calculó las inversas del tiempo de coagulación y se dividió entre los mg de proteína utilizada.

En la determinación el efecto anticoagulante de las fracciones de *O. rosea*, se hicieron pre incubados de 500 uL, mezclando volúmenes iguales de veneno o trombina con las Fa, F-2 y F-5, en tubos independientes, a los que se llevó a 37°C x 10 minutos; en todos los casos se empleó el doble de la concentración para las enzimas y para las fracciones. Luego, 100 uL de cada preincubado fueron adicionados a las mezclas de reacción que contenían plasma o fibrinógeno, midiéndose el tiempo de coagulación en segundos. Se utilizaron como controles los tiempos de coagulación de la trombina y del veneno, respectivamente¹³.

Los preincubados que se prepararon fueron los siguientes: Fa+ veneno, F-2+veneno, F-5+veneno, Fa+ trombina, F-2 +trombina y F-5+ trombina.

El porcentaje de inhibición de la actividad coagulante se halló por la sustracción de 100 menos el % de Actividad Específica Coagulante (AEC) de cada una de las muestras (100 - % AEC).

Actividad amidolítica

Se determinó empleando el método de Erlanger *et al.*, utilizando el sustrato cromogénico Benzoil-Arginil-p-nitroanilida (BAPNA) de la marca Sigma Chem. Se midió la liberación de p-Nitroanilina por espectrofotometría. La mezcla de reacción contenía 1,5 mL de BAPNA a una concentración de 9×10^{-4} M, 0,5 mL de buffer Tris-HCl 0,05M pH 8,1 y 100 μ L de la muestra (veneno de serpiente o preincubados). Luego de 15 minutos de incubación a 37 °C la reacción se detuvo la reacción con 1 mL de ácido acético glacial al 60 %, tomándose la lectura en el espectrofotómetro a 405 nm. La Actividad Específica Amidolítica (AEA) fue calculada por los moles de p-Nitroanilina liberados por minuto por miligramo de proteína (U/mg)¹⁴.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Separación de las fracciones F-2 y F-5 de *O. rosea*

La marcha fitoquímica reveló que la fase acuosa obtenida, así como las fracciones F-2 y F-5 dieron resultados positivos para fenoles totales y flavonoides, tabla 1. Además, fueron evaluados taninos por su capacidad precipitante de proteínas, saponinas por su acción detergente y carbohidratos por su asociación con algunos flavonoides; los que podrían modificar las actividades de las fracciones sobre la Tb y EST. La cromatografía en capa fina (CCF) utilizando celulosa permitió aislar dos bandas cromatográficas, con coeficiente de retardo (Rf) de 0,18 para F-2 y 0,90 para F-5. El Rf para el estándar Rutina fue de 0,36, este es un flavonol glicosilado en la posición 3 con ramnoglucosil (ramnosa y glucosa) lo que indica

que se trata de un compuesto polar. Pero, la F-2 mostró ser más polar por presentar un valor de Rf más pequeño. Estas diferencias de polaridad permitieron una apropiada separación de las fracciones utilizando etanol: agua (1:5) como fase móvil (tabla 1). Por otra parte, los rendimientos encontrados fueron de 30,12 % y 45,18 % para F-2 y F-5 respectivamente, es decir, que a partir de 1000 mg de la fase acuosa obtuvimos 301,20 mg (F-2) y 451,80 mg (F-5).

Estudios sobre la inhibición de la trombina por extractos vegetales han demostrado que son los flavonoides y sus derivados glucosilados los responsables. Los resultados muestran que las fracciones F-2 y F-5 se tratarían de flavonoides, lo que concuerda con los trabajos publicados por varios investigadores^{1,7,8}.

Tabla 1. Marcha fitoquímica y separación de las F-2 y F-5 de *O. rosea*.

Pruebas	Fase acuosa	F-2	F-5	Rutina
Fenoles totales: Cloruro férrico	+	+	+	+
Flavonoides: Shinoda	+	+	+	+
Taninos: Gelatina	+	-	-	-
Carbohidratos: Molish	+	+	-	+
Saponinas: Afrosimétrico	+	-	-	-
Rf	NA	0,18	0,90	0,36

Presencia: +, ausencia: -. Método: cromatografía en capa fina en celulosa. Fase móvil etanol: agua (1:5).

Rf: coeficiente de reparto. Fracción 2: F-2. Fracción 5: F-5. Flavonoide Estándar: rutina. NA: no aplica

Se han encontrado algunos flavonoides obtenidos de plantas cuyas acciones antiinflamatorias, cicatrizantes, anticoagulantes y antioxidantes han sido demostradas^{3,4,5,9}. En este camino, la exploración de plantas utilizadas tradicionalmente en nuestro país ha posibilitado la obtención de dos constituyentes en los extractos de *O. rosea* capaces de alterar la actividad enzimática de la Tb y la EST; debido que, existen evidencias previas y tradicionales de su acción antitrombótica en personas afectadas³.

Actividad coagulante de la trombina y la inhibición por F-2 y F-5

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados de la acción coagulante de la trombina sobre el fibrinógeno bovino y el efecto inhibitorio de las F-2, F-5 y de la Fa. Como puede observarse, la Tb produce coágulos a tiempos no proporcionales con su concentración. Por lo que, se ha estimado calcular la Actividad Específica Coagulante (AEC) utilizando la inversa del tiempo de coagulación entre mg de proteína total.

En la cascada de coagulación, la Tb tiene un rol fundamental que depende de la conversión del zimógeno protombina (68 kDA) a su forma activa (32 kDA). En este proceso, la trombina ataca las cadenas A α y B β del fibrinógeno liberando fibrinopéptidos A y B, respectivamente,

es así, que el monómero de fibrina resultante se convierte en polímero de fibrina insoluble, es decir en coágulo. Los coágulos estables (trombos) formados no se degradan rápidamente, si no se aplica un componente bioactivo específico como el que se está investigando. La trombina es una serina proteasa inhibida por el complejo endógeno heparina – antitrombina C y también por el reactivo fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), el cual genera una reacción irreversible con la serina 195, constituyente del sitio activo de la enzima¹⁵.

Por otro lado, la preincubación de la Tb con la Fa, así como las F-2 y F-5 (tabla 3) señalan claramente que los tiempos de coagulación iniciales se alargan, de acuerdo con los porcentajes de inhibición indicados. Es interesante notar que F-5 tiene la mayor actividad anticoagulante (67,78 % de inhibición), seguida de F-2 (58,58 %) y Fa (57,40 %).

Algunas investigaciones han mostrado que los flavonoides como las quercetinas (Quer), pueden actuar como inhibidores competitivos de la trombina debido a su acoplamiento estérico a la His 57, parte del centro activo de la enzima, dicho acoplamiento es más estable si el flavonoide está glicosilado como ocurre con la Quer-ramnosil y la Quer-arabinosa⁷. Por otra parte, utilizando técnicas de acoplamiento molecular han identificado flavonoides como potentes inhibidores de la trombina, estos son: miricetina, scutellareína, isorhamnetina, miricitrina, baicalina, apigenina e hidroxigenkwanina. Los investigadores indicaron, que los carbonos (C) que tenían mayor importancia en la inhibición de la enzima fueron: C2, C3 y C4 del anillo C; los C5 y C7 del anillo A; los C3', C4' y C5' en el anillo B, además, los enlaces C = C, C = O y los sustituyentes O- metoxilo y O- glicosilo, Wang *et al.*⁹.

Tabla 2. Acción coagulante de la trombina sobre fibrinógeno bovino.

Trombina bovina Unidades	*Tiempo de coagulación (s)
4	18,67 ± 1,53
2	29,00 ± 1,00
1	43,00 ± 1,00

1unidad= 0,02 mg/ mL de trombina.

*Promedio± DS, n=3

Tabla 3. Inhibición de la actividad coagulante de la trombina por las F-2 y F-5 de *O. rosea*

Muestras	Tiempo de Coagulación (s)	* AEC x10 ⁻³	% AEC	% de Inhibición
Control:				
Trombina 0,02 mg/mL	29	6,896 ± 0,60	100	--
Fase acuosa + trombina	68	2,941 ± 0,40	42,60	57,40
F-2 + trombina	70	2,857 ± 0,50	41,42	58,58
F-5+ trombina	90	2,222 ± 0,60	32,22	67,78

*Promedio± DS, n=3. Enzima: Trombina (1Unidad)=0,02 mg/mL.

Sustrato: Fibrinógeno bovino. F-2: Fracción - 2. F-5: Fracción-5.

AEC: Actividad Especifica Coagulante

Inhibición de actividad coagulante de la Enzima Similar a Trombina del veneno de la serpiente *L. muta* por la F-2 y F-5 de *O. rose*

La tabla 4 muestra los tiempos de prolongación de la coagulación, así como, las reducciones de la AEC cuando se utiliza el veneno de *L. muta* que contiene altas concentraciones de EST. En esta se aprecia la mayor actividad anticoagulante de F-5 en relación con F-2. Sin embargo, la actividad anticoagulante más elevada la presenta la fase acuosa, es decir del extracto acuoso total, que tiene un valor mayor que los encontrados en las fracciones. En la purificación de muchos componentes bioactivos, especialmente de origen vegetal, se observa la reducción de la actividad cuando ellos están separados, es decir, al parecer habría un sinergismo. Los componentes con una acción biológica definida cuando se encuentran en extracto total tienen mayor actividad que cuando se les separa.

En esta investigación se logró aislar dos fracciones (F-2 y F-5) capaces de prolongar el tiempo de la coagulación, al inhibir a la Tb y a la EST del veneno de *L. muta*. Sin embargo, el estudio debe continuar ya que estamos interesados en conocer la estructura química de estas fracciones, por la importancia y significado que tendría contar con fitoquímicos anticoagulantes que podrían ser utilizados en patologías trombóticas.

Tabla 4. Inhibición de la actividad coagulante de EST de *L. muta* por las F-2 y F-5 de *O. rosea* sobre de fibrinógeno bovino y el plasma humano citratado

Muestras	Flavonoide (ug)	*AEC x10 ⁻³ Fb	% de Inhibición	*AEC x10 ⁻³ PHC	% de Inhibición
Control: <i>L. muta</i> 0,036 mg/mL		193 ± 0,70	---	76,04 ± 0,90	--
Fase acuosa + veneno	600	19,15 ± 0,80	90,08	28,04 ± 0,70	63,58
F-2 +veneno	24	172,41 ± 0,70	10,67	50,70 ± 0,70	34,14
F-5+ veneno	24	123,00 ± 0,60	36,27	22,56 ± 0,60	70,69

* Promedio ± DS, n=3. Sustratos: Fibrinógeno bovino (Fb) y Plasma humano citratado (PHC)

Enzima: EST de *L. muta* 1mg/mL leído a 280 nm, F-2: Fracción-2, F-5: Fracción-5.

Flavonoide estándar: rutina. AEC: Actividad Especifica Coagulante

La actividad coagulante que presenta el veneno de *L. muta* es una de las más potentes en la familia de las serpientes viperidae (900 unidades NIH de Tb/mg), solo superada por su homóloga la “víbora de malasia” *Calloselasma rhodostoma* (1200 NIH Tb/mg); pero además, los coágulos de fibrina formados por estas proteínas son muy semejantes a los formados por la Tb; esto es, debido a que hay un ataque simultáneo o sucesivo a las cadenas A α y B β del fibrinógeno para originar el monómero de fibrina. La mayoría de las serpientes de esta familia, se caracterizan por formar coágulos inestables debido a que el veneno solo ataca a una de las 2 cadenas A α o B β . Por otra parte, es necesario considerar que la Tb y EST tienen sus centros activos semejantes con la triada catalítica: His57, Asp 102 y Ser 195; lo que motivó su utilización en esta investigación. Adicionalmente, es necesario indicar que la EST no es inhibida por heparina ni tampoco se origina de un zimógeno (protombina) como es el caso de la Tb¹⁵.

Nótese también en las tablas 3 y 4, que los % de inhibición registrados para Tb y EST sobre el fibrinógeno bovino es muy distante para cada una de las fracciones 58,58 % y 10,67 % para F2, así como, 67,78 y 36,27 % para F-5.

Asimismo, la tabla 4 registra los valores de inhibición obtenidos con F-2 y F-5 al utilizar plasma humano citratado, los valores encontrados fueron mayores (F-2 34,14 % y F-5 70,69 %) a los obtenidos con fibrinógeno como sustrato (F-2 10,67 % y F-5 36,27 %). Por otro lado, los valores de actividad amidolítica de EST usando BApNA como sustrato muestran inhibiciones de 50,20 % y 69,10 % con F-2 y F-5, respectivamente; mientras que, con la trombina los valores de inhibiciones encontrados fueron de 48,48 % para F-2 y 67,32 % para la F-5.

Es conocido que, la Tb y la EST atacan al sustrato cromogénico BApNA al reconocer a la Arg como el aminoácido sobre el que actúan en las cadenas del fibrinógeno, liberando en este caso p-nitroanilina de color amarillo (tabla 5).

Un estudio acerca de la inhibición del Factor Xa utilizando análisis bioinformático reveló que los flavonoides procianidina B2, la cianidina, la quercetina y la silibina se unen a la Ser 195 del sitio activo, a través de sus dos grupos OH del flavonoide impidiendo la reacción normal con la Arg⁸. Estos resultados concuerdan con los reportados para los flavonoides miricetina, scutellareína, isorhamnetina, baicalina e hidroxigenkwanina, que indican la interacción entre los flavonoides con la Ser 195 inhibiendo de esta manera a la trombina⁹. La serina en la Tb como en la EST ocupa la misma posición, como aminoácido central, en el sitio activo.

Tabla 5. Inhibición de la actividad amidolítica de la Tb y EST de *L. muta* por las F-2 y F-5 de *O. rosea*

Muestras	Flavonoide (ug)	*Actividad Específica Amidolítica (AEA) U/mg de proteína x10 ⁻³	% de AEA	% Inhibición de AEA
Trombina				
0,020mg/mL		24,95 ± 0,40	100	0
Fase acuosa + trombina	600	8,52 ± 0,70	34,15	65,85
F-2 + trombina	24	12,85 ± 0,30	51,52	48,48
F-5+ trombina	24	8,15 ± 0,40	32,68	67,32
<i>L. muta</i> 0,036 mg/mL				
Fase acuosa + veneno		22,91 ± 0,70	100	0
F-2 + veneno	600	7,35 ± 0,50	32,08	67,85
F-2 + veneno	24	11,41 ± 0,40	49,80	50,20
F-5+ veneno	24	7,08 ± 0,50	30,90	69,10

*Promedio± DS, n=3. Sustrato: BApNA. Enzimas: Tb y EST de *L. muta* 1mg/mL leído a 280 nm. Fracción – 2: F-2, Fracción-5: F-5. Flavonoide estándar: Rutina.

CONCLUSIONES

En esta investigación se ha demostrado que en *O. rosea* existen por lo menos dos principios con actividad anticoagulante F-2 y F-5, los cuales fueron obtenidos mediante una cromatografía en capa fina de la fase acuosa.

F-5 mostró mayor acción anticoagulante con respecto a F-2, a juzgar por los valores de inhibición de trombina y enzima similar a trombina del veneno de *L. muta*.

Asimismo, la actividad amidolítica usando BApNA como sustrato, registró una fuerte inhibición cercana al 70 %, especialmente por parte de F-5.

Siendo el presente, un trabajo pionero en la búsqueda de componentes bioactivos capaces de inhibir la capacidad tóxica de los venenos de serpientes; esta investigación debe ampliarse determinando la estructura química de las fracciones aisladas, para estudiar sus potenciales farmacológicos en los tratamientos de los envenenamientos ofídicos.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada con recursos determinados - CANON 2015; (Res. VRIN No 083-2015-UNFV).

A los docentes de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Medicina Hipólito Unanue de la Universidad Nacional Federico Villarreal por las facilidades brindadas.

Al Bch. Dante Arturo Rueda por todo el apoyo brindado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bijak M, Ponczek MB, Nowak P. Polyphenol compounds belonging to flavonoids inhibit activity of coagulation factor X. *Int J Biol Macromol*. 2014; 65: 129- 135.
2. Tello-Cerón G, Flores M, Gómez V. Uso de las plantas medicinales del distrito de Quero, Jauja, Región Junín, Perú. *Ecol Apl*. 2019; 18(1):11-20.
3. Yarlequé M, Rueda L, Yarlequé L. Efecto anticoagulante *in vitro* del extracto acuoso de *Oenothera rosea* Aiton” chupasangre”. Póster presentado en: VI Jornadas San Fernandinas; 2007 sept 8 -10; UNMSM. Lima, Perú.
4. Díaz HV, Fuertes C, Whu D, Jurado B, Roque M, Arroyo J. Efecto antiagregante plaquetario in vivo y fibrinolítico *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton (chupasangre). *Rev Soc Qui Perú*. 2011; 77(3):225-234.
5. Huari E, De la Cruz LA. Efecto terapéutico del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* A. “chupasangre”, en forma de crema farmacéutica. [Tesis para optar Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.

6. Villena NC, Arroyo J. Efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* (yawar socco) en ratas con inducción a la inflamación aguda y crónica. *Ciencia e Investigación*. 2012; 15(1):15-19.
7. Rodrigues CF, Gaeta H, Belchor M, Ferreira M, Pinho MV, Toyama D, Toyama M. Evaluation of Potential Thrombin Inhibitors from the White Mangrove (*Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn.). *Mar Drugs*. 2015; 13(7): 4505-4519.
8. Bijak M, Sut A, Kosiorek A, Saluk-Bijak J, Golanski J. Dual Anticoagulant/Antiplatelet Activity of Polyphenolic Grape Seeds Extract. *Nutrients*. 2019;11(1):93. doi: 10.3390/nu11010093.
9. Wang X, Yang Z, Su F, Li J, Owusu E, Chang Y, *et al.* Study on Structure Activity Relationship of Natural Flavonoids against Thrombin by Molecular Docking Virtual Screening Combined with Activity Evaluation *in vitro*. *Molecules*. 2020; 25(2): 422. doi:10.3390/molecules25020422
10. Yarlequé M, Ortiz C, Morante Y, Yarlequé A. Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo. *Rev Soc Quím Perú*. 2012; 78(1): 27-36.
11. Lock O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2016.
12. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of contents in mulberry and their scavengin effect on superoxide radicals. *Food Chem*. 1999; 64: 555-559.
13. Copley A. Studies of snake venom on the blood coagulation. I. The Thromboserpentin enzyme in venoms. *Thombos Res*. 1973; 1(2): 487-508.
14. Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 1961; 95: 271-278.
15. Ruiz L, Vivas D, Lazo F, Seiferta W, Rodríguez E, Sandoval G, *et al.* Purificación y caracterización bioquímica de la enzima similar a trombina del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*. *Rev Soc Quím Perú*. 2017; 83(4): 463-474.

BIOSORCIÓN DEL COLORANTE AZUL DE METILENO USANDO LOS CLADODIOS DE LA TUNA (*Opuntia ficus indica*)

Carmencita Lavado Meza^a, Rosario Sun Kou^b, Tracy Castro Arroyo^c

RESUMEN

La biosorción es un proceso efectivo para la remoción de colorantes sintéticos desde soluciones acuosas. Se estudió el uso de la biomasa de los cladodios de la tuna (BCT) para remover el colorante catiónico azul de metileno (AM) de la solución acuosa. Las técnicas de caracterización: FTIR, SEM y punto de carga cero (pHPCC) muestran las características químicas y físicas de la BCT. Se evaluaron los parámetros experimentales que afectan el proceso de biosorción, como el pH, tiempo de contacto y la dosis de biomasa/volumen, en un sistema estacionario. Los datos experimentales del equilibrio se ajustaron al modelo de la isoterma de Langmuir, la capacidad máxima de biosorción del AM fue de 156,25 mg/g con una dosis de BCT/volumen de 4 g/L, pH 8 y tiempo de contacto de 120 min. Los datos cinéticos se pueden describir bien con el modelo de pseudo-segundo orden, la biosorción parece estar controlada por la quimisorción y puede estar involucrada con la adsorción sobre la superficie y la difusión en los poros durante todo el proceso de biosorción. Se demostró que la BCT se constituye como un biomaterial prometedor, eficiente y biodegradable para eliminar el AM de las aguas residuales.

Palabras clave: biosorción, isotermas, azul de metileno, cinética.

BIOSORPTION OF DYE METHYLENE BLUE USING THE CLADODES OF THE TUNA (*Opuntia ficus indica*)

ABSTRACT

Biosorption is an effective process for removing synthetic dyes from aqueous solutions. The use of prickly pear cladode biomass (PCB) was studied to remove the methylene blue cationic dye (MB) from the aqueous solution. The characterization techniques: FTIR, SEM and point of zero load (pHPZC) show the chemical and physical characteristics of PCB. Experimental parameters that affect the biosorption process, such as pH, contact time and

^a Facultad de Ingeniería Ambiental, Universidad Continental Av. San Carlos 1980, Huancayo, Perú, carmencita.lavado@pucep.pe

^b Sección Química. Departamento Académico de Ciencias, Pontificia Universidad Católica del Perú, Av. Universitaria 1801, Lima, Perú.

^c Facultad de Ingeniería Ambiental, Universidad Alas Peruanas, Coronel Parra 2036, Huancayo, Perú.

biomass / volume dose, were evaluated in a continuous system. The equilibrium experimental data were adjusted to the Langmuir isotherm model, the maximum biosorption capacity of the MB was 156.25 mg / g with a dose of PCB/volume of 4 g / L, pH 8 and contact time of 120 min. Kinetic data can be well described with the pseudo-second order model, biosorption appears to be controlled by chemisorption and may be involved with adsorption on the surface and diffusion into the pores throughout the biosorption process. PCB was shown to be a promising, efficient, and biodegradable biomaterial for removing AM from wastewater.

Key words: Biosorption, isotherms, methylene blue, kinetics.

INTRODUCCIÓN

Los colorantes sintéticos se usan ampliamente en todo el mundo en una amplia gama de productos de las industrias textiles, papeleras, alimentarias, cosméticas y farmacéuticas¹, estos colorantes, son estables y no biodegradables y están diseñados para mantener el color en varios materiales y ser resistentes al agua, jabón y agentes oxidantes². Las aguas residuales que contienen colorantes al ser descargadas en los recursos hídricos inhiben la penetración de la luz solar y disminuyen la acción fotosintética, así mismo estas aguas se caracterizan por poseer una alta demanda química de oxígeno (DQO), pH alto y toxicidad biológica³. La mayoría de los colorantes sintéticos son tóxicos y cancerígenos por lo que, si las aguas residuales que contienen estas sustancias no se tratan de manera efectiva, podrían ser responsables de daños ambientales graves y también representar una amenaza para la salud pública⁴. Los colorantes sintéticos se pueden clasificar como aniónicos, catiónicos y no iónicos. El azul de metileno (AM), clasificado en la categoría de colorante catiónico, es uno de los tintes ampliamente usados en la industria para teñir algodón, madera y seda⁵. El AM es tóxico, si se ingieren en grandes cantidades, produce efectos nocivos como gastritis, dolor de cabeza intenso, micción dolorosa y síndromes similares a la metahemoglobinemia, sudoración profusa, confusión mental y toxicidad respiratoria⁶. Por lo general, las aguas residuales coloreadas se tratan mediante procesos fisicoquímicos como ultrafiltración, coagulación, fotooxidación, pero estos tratamientos tienen limitaciones como: formación de subproductos tóxicos, para su funcionamiento requieren grandes cantidades de energía y no se adaptan a la amplia gama de tintes que existen en el mercado⁷, las desventajas de estos métodos han motivado a investigar métodos alternativos para la eliminación de colorantes, una de ellas es la adsorción, esta técnica se ha empleado ampliamente para la eliminación de colorantes donde se utiliza un adsorbente sólido para atraer la molécula de colorante y finalmente conducir a su eliminación del medio acuoso, el material más usado como adsorbente es el carbón activado, pero su uso es limitado debido a su alto costo y baja capacidad de regeneración, estas limitaciones llevaron a los investigadores a explorar la adsorción o biosorción usando materiales alternativos abundantes, disponibles y de bajo costo, como subproductos agrícolas (hojas, grano, semillas, raíz, etc.) hongos, plantas, algas y bacterias². La tuna (*Opuntia ficus indica*) es una especie de naturaleza xerófila, de la familia de los cactáceas es nativa de México pero se naturalizó en toda la cuenca mediterránea y en las zonas templadas de América, África, Asia y Oceanía, que se encuentra en abundancia en

la región sierra en Perú⁸. Los cladodios del cactus están constituidos principalmente por un heteropolisacárido con un peso molecular de 23104 a 3106 g/mol, el mucílago es una mezcla de polisacáridos ácidos y neutros que consisten principalmente en arabinosa; galactosa ácido galacturónico; ramnosa y xilosa, los grupos funcionales de estos compuestos podrían actuar con las moléculas de los colorantes removiéndolos de la solución matriz⁹. El objetivo del presente estudio fue evaluar la potencialidad de la biomasa de los cladodios de la tuna (BCT) para ser usado como biosorbente para remover el colorante azul de metileno de una solución acuosa, constituyéndose así como una alternativa eficiente para eliminar colorantes de las aguas residuales, para ello se caracterizó física y químicamente la BCT y se evaluó la influencia de la dosis de la biomasa en un volumen fijo de la solución con AM (g/L), pH y tiempo, sobre la capacidad de remoción del AM.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparación del biosorbente:

Los cladodios del cactus fueron recolectados en el distrito de Pilcomayo Región Junín, se eliminaron los residuos con abundante agua destilada, se retiraron las espinas y se cortaron en trozos pequeños y posteriormente se llevaron a secar al horno a 60°C durante 72 horas, el material seco fue molido y tamizado a malla 70 μm , obteniéndose de esta manera la biomasa de los cladodios de la tuna (BCT).

Caracterización del biosorbente:

Los grupos funcionales presentes en la superficie de biosorbente se identificaron por espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR) en un Espectrofotómetro SHIMADZU FTIR- 8700 la muestra se analizó en un rango espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . La microscopía electrónica de barrido (SEM) modelo SU 8230Evo15, marca Hitachi, se utilizó para estudiar la morfología de la superficie del adsorbente. La determinación de los grupos ácidos se llevó a cabo siguiendo el método Boehm, descrito por Aygün *et al.*¹⁰ en el que se emplea una base fuerte, como el NaOH, para neutralizar los centros ácidos presentes en la superficie de la BCT, se pesó 0,25 g de la BCT, se agregó 50 mL de NaOH 0,05 M (estandarizado con biftalato ácido de potasio) esta mezcla se agitó por 24 horas a una velocidad de 100 rpm, luego se tomó 20 mL de la solución remanente y se tituló con 0,05 M de HCl (estandarizado con la solución 0,05 M de KOH) usando como indicador azul de bromocresol. El punto final es indicado por el viraje de azul a verde de la solución, con el gasto obtenido (mL) se calculó los moles de grupos ácidos, los resultados se expresaron en mmolH⁺/g BCT. Para la determinación del pHPCC se procedió de acuerdo a lo reportado por Moghazy, *et al.*⁵ Para ello se prepararon soluciones con diferentes pH, mezclando en cada solución 50 mL de agua destilada con 0,1 g de BCT en un matraz erlenmeyer con tapa, el pH se varió con soluciones de NaOH 0,1 M y HCl 0,1 M, la mezcla se mantuvo en agitación constante (150 rpm) durante 15 min, transcurrido este tiempo se midió el pH final (pH_f), todos los datos se obtuvieron por triplicado. Se graficaron los valores de ΔpH ($\Delta\text{pH} = \text{pH}_o - \text{pH}_f$) versus pH inicial (pH_o), el punto de carga cero (pHPCC) se obtuvo de la gráfica cuando $\Delta\text{pH} = 0$.

Biosorción del azul de metileno:

Se preparó una solución stock de AM de 500 mg/L a partir de ella se prepararon las diferentes concentraciones necesarias, la biosorción del AM se llevó a cabo en un sistema discontinuo, utilizando 50 mL de muestra de solución del colorante en matraces Erlenmeyer en un equipo de agitación múltiple marca Velp, a una velocidad 150 RPM y temperatura 20 °C, se realizó el estudio de la influencia de la dosis usando diferentes cantidades de BCT en un rango de 0,025 – 0,3 g. Para determinar el equilibrio cinético, se ensayó a diferentes intervalos de tiempo (5 -180 min). El equilibrio de biosorción se evaluó a diferentes concentraciones iniciales de AM (20-300 mg/L de AM). El estudio de la influencia del pH se realizó ajustando el pH a valores comprendidos entre 2,0 - 8,0 con soluciones de HCl y NaOH 0,1 M. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y los resultados presentados son las medias correspondientes. En cada uno de los casos luego del experimento, las fases se separaron por filtración. Las concentraciones de colorante AM en las muestras se midieron mediante un espectrofotómetro UV (Beckman Du 64 UV/VIS) a una longitud de onda de 663 nm. La cantidad de AM retenido por el biosorbente (q_e) y el porcentaje de biosorción se calcularon mediante las ecuaciones 01 y 02, respectivamente.

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)}{M} \times V \quad (1)$$

$$\%R = \frac{(C_0 - C_e)}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

Donde: C_0 y C_e son la concentración inicial y final del AM en la solución (mg/L) antes y después de la biosorción respectivamente, M es la masa del BCT (g), y V es el volumen de la solución (L).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la biomasa:

Para comprender cualquier posible interacción entre los grupos funcionales de la superficie de la BCT y el colorante MB, se estudió la BCT utilizando espectroscopía FTIR (figura 1)

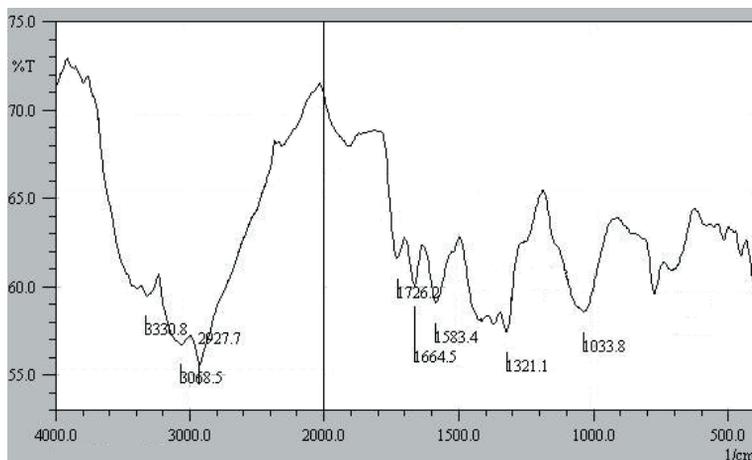


Figura 1. Espectro FTIR de la biomasa de la BCT.

El análisis espectroscópico evidenció una banda ancha en el rango espectral de 3600-3000 cm^{-1} que se le atribuye a las vibraciones de estiramiento del O-H y N-H, lo que indica la presencia del -OH en carboxilos y presencia de aminas², otra banda a 2927 cm^{-1} debido a la vibración asimétrica del enlace C-H de los grupos alifáticos, la banda a 1726 cm^{-1} se le atribuye a la deformación del -C=O , la banda a 1664,5 cm^{-1} es debido a las vibraciones del enlace C=C aromático¹¹. La banda ancha a 1033 cm^{-1} se atribuye a la deformación simétrica de alquil éteres y C-O-C presentes en los polisacáridos¹². Los picos a 1583,4 y 1321,1 cm^{-1} corresponden al estiramiento y deformación, respectivamente del enlace C-N presentes en aminas aromáticas¹³. La presencia de grupos hidroxilo OH, carbonilo C=O, éteres C-O-C en grupos aromáticos, aminas aromáticas, en la estructura lignocelulósica del biosorbente le confiere a la BCT capacidad para interactuar con el AM.

Se determinó la cantidad de grupos ácidos mediante el método Boehm, el cual demostró que la BCT posee una acidez total superficial de 7,34 mmolH^+/g , que puede deberse a la presencia de los grupos funcionales reportados en el análisis del espectro FTIR (figura 1), los cuales podrían interactuar con el colorante catiónico AM.

La morfología de la superficie del biosorbente se caracterizó por SEM. Como se ve en la figura 2, el biosorbente exhibe una morfología de superficie heterogénea y porosa (figura 2A), tal forma estructural facilitaría el proceso de biosorción porque proporciona un área superficial. Por otro lado, después de la biosorción se observa una morfología superficial más homogénea y con menos presencia de cavidades. Esto se debería a la ocupación de la superficie biosorbente por las moléculas de colorante².

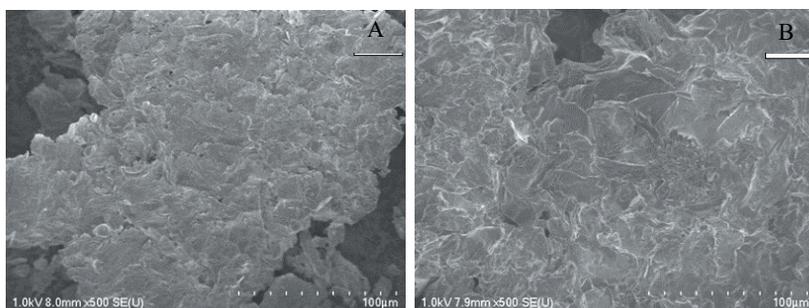


Figura 2. SEM de la BCT A) Antes de la biosorción B) Después de la biosorción.

El pHPCC es el pH al cual la carga superficial neta en el biosorbente es cero, muestra la tendencia de la superficie biosorbente para cargarse positiva o negativamente dependiendo del pH, si el $\text{pH} < \text{pHPCC}$ La superficie del biosorbente está cargada positivamente, favoreciéndose la biosorción de colorantes aniónicos, por otro lado, si el $\text{pH} > \text{pHPCC}$, la superficie biosorbente está cargada negativamente y esto favorece la biosorción de colorantes catiónicos¹⁴. La figura 3 muestra que el pHPCC de la BCT es 4,3. Por lo tanto a $\text{pH} > 4,3$ la densidad de carga negativa en la superficie del biosorbente aumenta y, por lo tanto, se logra una mayor capacidad de biosorción debido a la creciente atracción electrostática entre las moléculas de colorante catiónico y los grupos funcionales del material biosorbente.

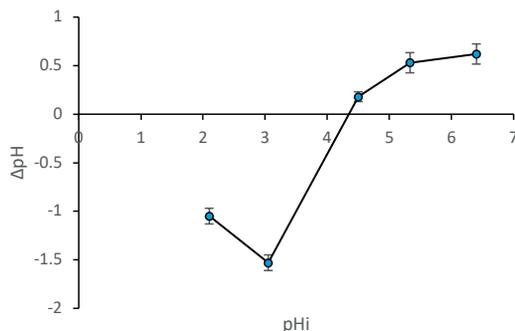


Figura 3. Determinación del pHPCC de la BCT.

Influencia de la dosis del biosorbente:

Los datos obtenidos de los experimentos con diferentes dosis de biosorbente en 50 mL de solución, se presentan en la figura 4. El aumento de la dosis de la BCT de 0,025 a 0,3g da como resultado un incremento en el rendimiento de la biosorción de 51 % a 98 %, respectivamente, este comportamiento podría deberse a un aumento en el número de posibles sitios de unión y área de superficie del biosorbente. Un aumento adicional en la concentración de biomasa sobre 0,2g/50 mL no condujo a una mejora significativa en el rendimiento de la biosorción, esto podría explicarse como consecuencia de una aglomeración parcial de biomasa, que resulta en una disminución en el área de superficie específica efectiva para la biosorción¹⁵. Se logró una máxima %R con una dosis de BCT con 0,2g/50 mL equivalente a 4g/L, motivo por lo cual esta dosis se fijó para todos los experimentos siguientes. Esta misma tendencia lo reportan Vijayaraghavan *et al.*⁷ quienes removieron AM usando una alga marina, donde alcanzaron una máxima %R con una dosis de 5g/L.

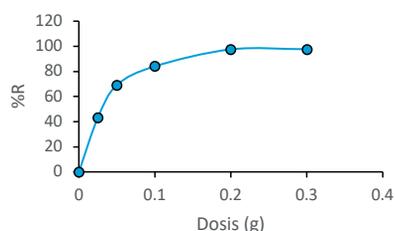


Figura 4. Influencia de la dosis de la BCT sobre el %R, V = 50 mL, Ci = 50 mg/L, T = 20oC, t = 120 min.

Influencia del tiempo de contacto y cinética de biosorción:

Los resultados del estudio de la influencia del tiempo sobre la capacidad de biosorción, se muestran en la figura 5.

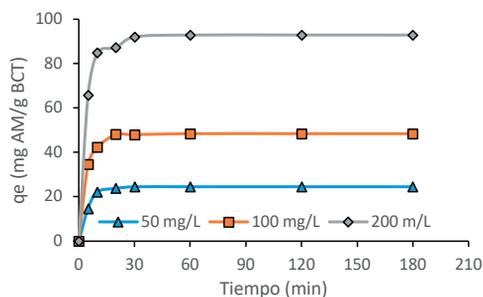


Figura 5. Efecto del tiempo de contacto sobre la biosorción de AM, masa BCT/ volumen = 4g/L, T = 20oC.

Se puede observar que para diferentes concentraciones iniciales la capacidad de biosorción aumentó rápidamente en los primeros 10 minutos y luego aumentó lentamente hasta alcanzar el equilibrio a los 120 minutos. La fase rápida inicial puede atribuirse a la existencia de una superficie descubierta de la BCT para el proceso de biosorción, posteriormente, a medida que los sitios de adsorción de la superficie se saturaron, la velocidad de biosorción disminuyó con el tiempo de contacto adicional. Por lo tanto, el tiempo de contacto óptimo se fijó en 120 minutos para el resto de los experimentos. Se observó que la cantidad de AM biosorbido aumentó con un aumento en la concentración inicial del colorante, esto puede explicarse en el supuesto que la fuerza impulsora para superar la resistencia a la transferencia de masa entre la fase sólida y líquida fue mayor en el caso de una mayor concentración de MB¹⁶. Varios investigadores informaron resultados similares de resultados para la adsorción de AM sobre residuos de eucalipto⁴, algas⁵, pepas de frutas y cáscaras de nuez¹⁰.

Estudio cinético:

Con la finalidad de investigar el mecanismo del proceso de eliminación del colorante AM, los datos cinéticos de biosorción se modelaron utilizando los modelos cinéticos de difusión pseudo-primero orden, pseudo-segundo orden y de difusión intrapartícula, ecuación 3,4 y 6¹⁴:

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_1}{2.303} t \quad (3)$$

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (4)$$

$$h = k_2 q_e^2 \quad (5)$$

$$q_t = k_{id} t^{1/2} + B \quad (6)$$

Donde, q_t y q_e es la cantidad de ion metálico retenido por unidad de masa de sorbente en un tiempo t y en el equilibrio, respectivamente (mg/g), k_1 la constante cinética de primer orden (1/min), k_2 (g/mg*min) es la constante de velocidad de adsorción y h es la tasa de adsorción inicial (mg/g min), k_{id} es la constante de velocidad de difusión intraparticular (mg/g * min^{1/2}) y B es una constante relacionada con el espesor de la capa límite del adsorbente (mg/g)

Los parámetros cinéticos de la ecuación de pseudo primer orden, pseudo segundo orden se calcularon luego de graficar $\log(q_e - q_t)$ vs t (figura 6A), t/q_t Vs t (figura 6B), y del segundo tramo lineal del gráfico q_t vs $t^{1/2}$ (figura 6C), respectivamente. Los resultados se presentan en la tabla 1, como se observa, los valores del coeficiente de correlación (R^2) del modelo de pseudo-segundo orden es igual a 0,999 para todos los valores de pH y las q_e calculadas a partir del modelo de pseudo-segundo orden coinciden muy bien con los datos experimentales, en comparación con el modelo de primer orden. Por lo tanto, la cinética de biosorción está mejor representada por el modelo de pseudo-segundo orden y esta se basa en el supuesto de que el paso de control de la velocidad puede ser quimisorción que involucraría intercambio de electrones entre el AM y los grupos funcionales (principalmente grupos hidroxilo y carboxilo) de la BCT¹⁵, como se observa en la tabla 1, la tasa de adsorción inicial [$h = k_2(q_e)^2$]

aumentó con el incremento de la concentración inicial de colorante, lo que indica que la capacidad de biosorción y la tasa de biosorción fueron más altas en las etapas iniciales. Esto podría estar respaldado por el aumento de la fuerza impulsora para la transferencia de masa a concentraciones iniciales más altas que permite que más moléculas de colorante alcancen la superficie de la BCT en un tiempo más corto¹⁶. Los modelos cinéticos de pseudo primer orden y pseudo segundo orden no son suficientes para explicar el mecanismo de difusión, por lo tanto, los resultados cinéticos se analizaron adicionalmente mediante el modelo de difusión intrapartícula (figura 6C y 6D) según este modelo, si la regresión de qt versus la raíz cuadrada del tiempo ($t^{1/2}$) es lineal, entonces la difusión intrapartícula está involucrada en el proceso de biosorción y si B es cero entonces la difusión intrapartícula es el único paso limitante de la velocidad. Como se muestra en la figura 6C, las gráficas no fueron lineales en todo el rango de tiempo, lo que revela que la difusión de poros no es el paso limitante de la velocidad y que tanto la adsorción superficial como la difusión intrapartícula existirían durante el proceso de biosorción¹⁷.

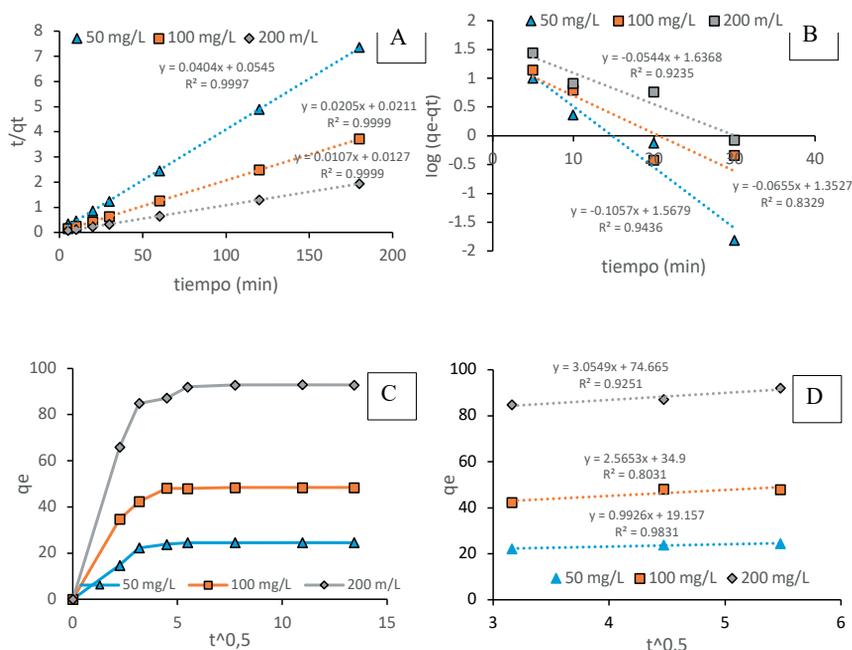


Figura 6. Cinética de biosorción del AM sobre la BCT A) pseudo primer orden B) pseudo segundo orden C) Difusión intrapartícula D) segunda porción lineal q_e Vs $t^{0.5}$.

Tabla 1. Parámetros cinéticos para la biosorción de AM sobre la BCT.

C _o mg/L	Pseudo primer orden			pseudo segundo orden				difusión intrapartícula		
	k ₁	q _e	R ²	q _e	h	K ₂	R ²	K _{id}	B	R ²
50	0,12	43,33	0,9235	24,75	18,35	0,03	0,9997	3,05	74,67	0,9251
100	0,15	22,53	0,8329	48,78	47,39	0,02	0,9999	2,57	34,90	0,8031
200	0,24	36,97	0,9436	93,46	78,74	0,01	0,9999	0,99	19,16	0,9831

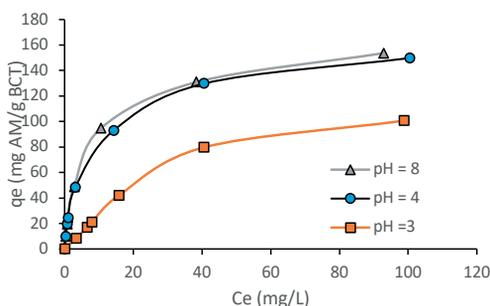
Isotermas de adsorción:

Una isoterma de adsorción describe la dependencia entre el contaminante adsorbido y el contaminante en fase acuosa en condiciones de equilibrio y temperatura constante¹⁷. La figura 5 muestra las isotermas de biosorción a diferentes valores de pH, la forma cóncava de las curvas de las isotermas indican la alta afinidad del adsorbato por el biosorbente, esta se asemeja a la isoterma del tipo L, según la clasificación de Giles *et al.*¹⁸ lo que sugiere una saturación progresiva del sólido sin alcanzar una capacidad límite, los datos experimentales fueron evaluados usando los modelos de isotermas de Langmuir y Freundlich, cuyas formas linealizadas se expresan en las ecuaciones 7 y 8, respectivamente⁵:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_{\max} b} + \frac{C_e}{q_{\max}} \quad (7)$$

$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (8)$$

Donde: q_e es la capacidad de biosorción en el equilibrio (mg/g); C_e es la concentración de equilibrio del AM en la fase líquida (mg/L), q_{max} y b son las constante de Langmuir, relacionadas con la máxima capacidad de biosorción para una monocapa completa (mg/g) y la afinidad entre el sorbente y el sorbato (L/mg), respectivamente, K_F es la constante de equilibrio (L/g) y n es una constante relacionada con la afinidad entre el sorbente y el sorbato.

**Figura 7.** Isotermas del equilibrio de la biosorción de AM sobre la BCT, masa BCT/volumen = 4g/L, T=20oC, t = 1 h.

Las constantes de Langmuir (q_{max} y b) y Freundlich (K_F y n) se calcularon a partir de la pendiente y la intersección de los gráficos lineales C_e/q_e versus C_e (figura 8A) y $\log q_e$ versus $\log C_e$ (figura 8B). Los parámetros de los modelos y los coeficientes de correlación se presentan en la tabla 2. En el caso del modelo de isoterma de Langmuir, se observó una muy buena correlación con los datos de biosorción basados en los coeficientes R^2 , los cuales son mayores a 0,96. La isoterma de Langmuir se basa en la suposición de que los sitios activos del biosorbente son homogéneos, este resultado sugiere la cobertura en monocapa de las moléculas del AM en la superficie de la BCT. El valor $1/n$ ($0 < 1/n < 1$) obtenido de la isoterma de Freundlich indica una buena capacidad de absorción del AM sobre la BCT, el factor de separación R_L se calculó para las tres isotermas y todos los valores se obtuvieron entre 0,11; 0,02; 0,01 lo que indica una biosorción favorable del AM sobre la BCT. Las capacidades máximas de biosorción suponiendo una biosorción en monocapa son 156,25; 158,73 y 156, 25 mg/g a pH 3, 4 y 8, respectivamente.

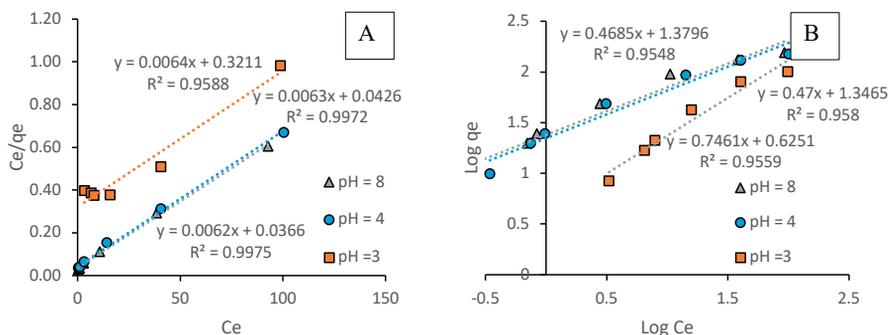


Figura 8. Estudio del equilibrio de la biosorción del AM A) Isoterma de Langmuir B) Isoterma de Freundlich

Tabla 2. Parámetros cinéticos para la biosorción de AM sobre la BCT.

pH	Langmuir				Freundlich		
	q_{max} (mg/g)	b (L/mg)	R_L	R^2	$1/n$	K_F (L/g)	R^2
3	156,25	0,02	0,11	0,9588	0,75	4,22	0,9559
4	158,73	0,15	0,02	0,9972	0,47	22,21	0,9580
8	156,25	0,26	0,01	0,9931	0,29	38,84	0,6791

En comparación con otros estudios de biosorción del colorante AM reportados en la literatura (tabla 3), los altos valores de q_{max} demuestran que el material biosorbente BCT tiene un gran potencial para la eliminación del AM del medio acuoso.

Tabla 3. Comparación de biosorción de AM con otros materiales biosorbentes.

Material biosorbente	q_{\max} (mg/L)	Referencia
Residuos de poda del árbol de olivo	129,87	Anastopoulos <i>et al.</i> ¹⁹
Madera de papaya	32,25	Rangabhashiyam <i>et al.</i> ²⁰
Conchas de almejas	1,09	Elwakeel <i>et al.</i> ¹⁵
Residuos de pino	129,87	Yagub <i>et al.</i> ²¹
Alga gracilaria corticata	95,41	Vijayaraghavan <i>et al.</i> ⁷
Cladodios de tuna (<i>Opuntia ficus indica</i>)	158,73	Este estudio

Influencia del pH:

La eficiencia de la biosorción depende del pH de la solución, debido a que un cambio en el pH conduce a la variación en el grado de ionización de la molécula adsorbida y las propiedades superficiales del adsorbente. La figura 9 muestra el efecto del pH de la solución inicial sobre la capacidad de biosorción del colorante AM (q_e) se observa que la cantidad adsorbida aumenta con el incremento del pH, se encontró que la cantidad de colorante adsorbido aumentó de 24,87 mg/g a 99,16 mg/g debido al cambio en el pH de 2,0 a 8 para una concentración de colorante inicial de 200 mg/L, el mismo comportamiento muestran las curvas a concentraciones iniciales menores (50 y 100 mg/L). Es evidente que se logró mayores capacidades de remoción a un valor de pH 8. El valor del punto de carga cero (pH_{pcc}) puede proporcionar información sobre la carga superficial del biosorbente (figura 3), cuando el $pH > pH_{pcc}$, la superficie de la BCT se carga negativamente por lo que podría adsorber eficazmente el colorante catiónico AM por atracción electrostática traduciéndose en el incremento de la capacidad de biosorción¹⁵, contrariamente a $pH < pH_{pcc}$, la superficie da la BCT se carga positivamente disminuyendo la capacidad de biosorción por repulsión electrostática², por otro lado, la alta capacidad de eliminación del AM a pH alto también se debería a la presencia de menos H^+ que compiten por los sitios de sorción en la biomasa. El pH bajo conduce a un aumento en la concentración de iones H^+ en el sistema, y la superficie de la BCT adquiere carga positiva por protonación de grupos carboxílicos y amino de la superficie lo que conlleva a la disminución de la capacidad de adsorción del colorante catiónico AM¹⁷.

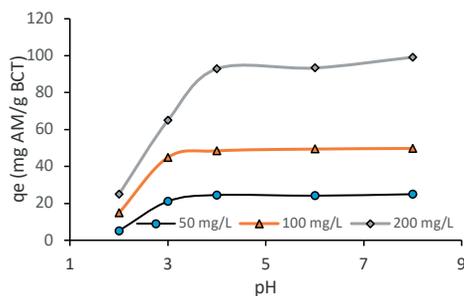


Figura 8. Influencia del pH sobre la capacidad de biosorción, dosis BCT/volumen = 4g/L, T=20oC, t = 120 min.

Desorción:

Para estudiar el potencial de reutilización del biosorbente se hicieron intentos para desorber el AM biosorbido en la BCT, para ello se empleó una solución de HCl 0,01 M como agente de desorción, con un tiempo de contacto de 120 min. El rendimiento fue de 80,2 %. Bajo condiciones ácidas fuertes, aumenta el número de sitios con carga positiva. Estos sitios con carga positiva en la superficie biosorbente favorecerían la desorción de los cationes del AM debido a la repulsión electrostática⁷.

CONCLUSIONES

Se investigó la remoción del AM de una solución acuosa uso la biomasa de los cladodios de la tuna (BCT) como material biosorbente. La concentración del biosorbente, el pH inicial de la solución, el tiempo de contacto jugaron un papel importante sobre la remoción del AM. Los resultados revelaron que el modelo cinético de pseudo-segundo orden se ajusta muy bien a la cinética de biosorción del AM sobre la BCT. Los datos de equilibrio de biosorción del AM coincidieron bien con el modelo de isoterma de Langmuir con una capacidad de adsorción de monocapa de 156,25 mg/g. El mecanismo de la biosorción se daría por un proceso de quimisorción e implicaría la adsorción sobre la superficie de la BCT y la difusión intrapartícula en los poros de la biomasa. Debido a que los cladodios de la tuna son un recurso natural, abundante, renovable, simple y ambientalmente amigable tiene un gran potencial para ser usado como biosorbente efectivo para la eliminación del colorante azul de metileno de los efluentes de aguas residuales.

AGRADECIMIENTO

Las autoras agradecen al Dr. Clemente Luyo de la Universidad Nacional Ingeniería por los análisis SEM/EDX realizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alver E, Ülkü A, Brouers F. Methylene blue adsorption on magnetic alginate/rice husk biocomposite. *Int J Biol Macromol.* 2020; 154: 104-113.
2. Albadarin AB, Solomon S, Abou M, Walker G. Efficient removal of anionic and cationic dyes from aqueous systems using spent Yerba Mate "*Ilex paraguariensis*". *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2018; 82: 144-155.
3. Afshariani F, Roosta A. Experimental study and mathematical modeling of biosorption of methylene blue from aqueous solution in a packed bed of microalgae *Scenedesmus*. *J Clean Prod.* 2019; 225: 133-142.
4. Han Q, Wang J, Goodman B, Xie J, Liu Z. High adsorption of methylene blue by activated carbon prepared from phosphoric acid treated eucalyptus residue. *Powder Technol.* 2020; 366: 239-248.
5. Moghazy R, Labena A, Husien Sh. Eco-friendly complementary biosorption process of methylene blue using micro-sized dried biosorbents of two macro-algal species (*Ulva fasciata* and *Sargassum dentifolium*): Full factorial design, equilibrium, and kinetic studies. *Int J Biol Macromol.* 2020; 134: 330-343.
6. Yagub MT, Kanti T, Afroz S, Ang HM. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014; 209: 172-184.
7. Vijayaraghavan J, Bhagavathi Pushpa T, Sardhar Basha SJ, Jegan J. Isotherm, kinetics and mechanistic studies of methylene blue biosorption onto red seaweed *Gracilaria corticata*, *Desalination Water Treat.* 2015; 1-9. doi: 10.1080/19443994.2015.1060174
8. León-Martínez F, Méndez-Lagunas L, Rodríguez-Ramírez J. Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization. *Carbohydr Polym.* 2010; 81: 864-870.
9. Barka N, Abdennouri M, El Makhfouk M, Qourzal S. Biosorption characteristics of cadmium and lead onto eco-friendly dried cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes. *J Environ Chem Eng.* 2013; 1: 144-149.
10. Aygün A, Yenisoý –Karakaş S, Dumana I. Production of granular activated carbon from fruit stones and nutshells and evaluation of their physical, chemical and adsorption properties. *Micropor Mesopor Mat.* 2003; 6: 189-195.
11. Daneshvar E, Vazirzadeh A, Niazi A, Sillanpää M, Bhatnagar A. A comparative study of methylene blue biosorption using different modified brown, red and green macroalgae – Effect of pretreatment, *Chem Eng J.* 2017; 307 (1): 435-446.
12. Morosanu I, Teodosiu C, Paduraru C, Ibanescu D, Tofan L. Biosorption of lead ions from aqueous effluents by rapeseed biomass. *N Biotechnol.* 2017; 39: 110-124.
13. Nharingo T, Moyo M. Application of *Opuntia ficus-indica* in bioremediation of wastewaters. A critical review. *J Environ Manag.* 2016; 166: 55- 72.
14. Deniz F, Tezel E. A low-cost and eco-friendly biosorbent material for effective synthetic dye removal from aquatic environment: characterization, optimization, kinetic, isotherm and thermodynamic studies. *Int J Phytoremediation.* 2019; 22: 353-362.
15. Elwakeel KZ, Elgarahy AM, Mohamma SH. Use of beach bivalve shells located at Port Said coast (Egypt) as a green approach for methylene blue removal. *J Environ Chem Eng.* 2017; 5(1): 578-587.

16. Nayak AK, Pa A. Green and efficient biosorptive removal of methylene blue by *Abelmoschus esculentus* seed: Process optimization and multi-variate Modeling. *J Environ Manag.* 2017; 200: 145-159.
17. Afroze S, Kanti T, Anga M, Nishioka H. Adsorption of methylene blue dye from aqueous solution by novel biomass *Eucalyptus sheathiana* bark: equilibrium, kinetics, thermodynamics and Mechanism, *Desalination Water Treat.* 2016; 57(13): 5858-5878.
18. Giles C, Smith D, Huitson A. A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. *J Colloid Interface Sci.* 1974; 47(3): 755–765.
19. Anastopoulos I, Margiotoudis I, Massas I. The use of olive tree pruning waste compost to sequester methylene blue dye from aqueous solution. *Int J Phytoremediation*, 2018; 20(8): 831–838.
20. Rangabhashiyam S, Lata S, Balasubramanian P. Biosorption characteristics of methylene blue and malachite green from simulated wastewater onto *Carica papaya* wood biosorbent. *Surf Interfaces.* 2018; 10:197-215.
21. Yagub MT, Kanti Sen T, Ang M. Removal of cationic dye methylene blue (MB) from aqueous solution by ground raw and base modified pine cone powder. *Environ Earth Sci.* 2014; 71: 1507–1519.

CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DEL *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis* (cahuato)

Jorge Chávez Fernández*, Virginia Lizárraga Lazo, Eleana Vargas de Nieto

RESUMEN

El género *Tecoma* consta de 14 especies, distribuidas en toda América; crece en zonas tropicales. En la región Arequipa – Perú, existen tres especies, siendo una de ellas la *T. fulva* subsp. *arequipensis*, la cual fue recolectada en el distrito de Sogay a 2 600 m.s.n.m. de la región Arequipa. Los componentes volátiles fueron extraídos por destilación con arrastre de vapor en agua, el rendimiento fue del 0,40 % en hojas y flores de muestra fresca obteniendo una resina blanca, densidad 0,85 g/mL, índice de refracción 1,464 a 20°C y soluble en etanol; se detectó la presencia de terpenos por cromatografía en capa fina. Por el método de extracción de maceración en diclorometano y éter de petróleo de hojas y flores de muestra seca con 13 % de humedad residual, se concentró en rotaevaporador obteniendo 5,4 % de extracto seco, el extracto fue analizado por cromatografía de gases acoplado a un espectro de masas (GC/EM), se identificó 11 componentes en hojas, siendo el componente mayoritario el terpinen-4-ol con 37,45 % de abundancia, del extracto diclorometánico. En el extracto etéreo de flores se identificaron 18 constituyentes, siendo el componente mayoritario el fitol con 16,38 % de abundancia. En el extracto etanólico de hojas de *T. fulva* subsp. *arequipensis* purificado por CC – CG/EM en tres fracciones se detectó la presencia de: fracción 1 se identificó γ -sitosterol con 50,1 % de abundancia, fracción 3 se identificó ácido hexadecanoico con 55,2 % de abundancia y en la fracción 4 se identificó 1,3-dihidro-3,3-dimetil-2H-indol-2-ona con 36,1 % de abundancia. El espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) confirmó la presencia de: alcoholes, fenoles, ácidos carboxílicos, cetonas α , β insaturadas, alquenos, hidrocarburos aromáticos y aminas; es importante resaltar que los componentes detectados e identificados son terpenoides y sesquiterpenoides.

Palabras clave: *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis*, extracto diclorometano, terpenos y sesquiterpenoides, GC-MS, FTIR.

Sección Química Orgánica. Departamento Académico de Química. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Calle Santa Catalina 117 – Cercado. Arequipa - Perú.
jchavezf@unsa.edu.pe

CHEMICAL PHYSICAL CHARACTERIZATION OF VOLATILE COMPONENTS OF *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis* (cahuato)

ABSTRACT

The genus *Tecoma* consists of 14 species, distributed throughout the Americas; grows in tropical areas. In the Arequipa - Peru region, there are three species, one of them being *T. fulva* subsp. *arequipensis*, which was collected in the Sogay district at 2 600 m.s.n.m. of the Arequipa region. The volatile components were extracted by steam distillation in water, the yield was 0.40% in fresh sample leaves and flowers, obtaining a whitresin, density 0.85 g / mL, refractive index 1.464 at 20°C and soluble in ethanol; the presence of terpenes was detected by thin layer chromatography. By the extraction method of maceration in dichloromethane and petroleum ether of leaves and flowers of a dry sample with 13 % residual humidity, it was concentrated in a rotary evaporator obtaining 5.4 % of dry extract, the extract was analyzed by gas chromatography coupled to In a mass spectrum (GC/MS), 11 components were identified in leaves, the majority component being terpinen-4-ol with 37.45 % abundance, of the dichloromethane extract. In the ether extract of flowers, 18 constituents were identified, the main component being phytol with 16.38 % abundance. In the ethanolic extract of leaves of *T. fulva* subsp. *arequipensis* purified by CC-GC/ MS in three fractions the presence of was detected: fraction 1 γ -sitosterol was identified with 50.1% abundance, fraction 3 hexadecanoic acid was identified with 55.2 % abundance and in fraction 4 1,3-dihydro-3,3-dimethyl-2H-indol-2-one was identified with 36.1% abundance. The Fourier transform infrared spectrum (FTIR) confirmed the presence of: alcohols, phenols, carboxylic acids, α , β unsaturated ketones, alkenes, aromatic hydrocarbons and amines; It is important to highlight that the components detected and identified are terpenoids and sesquiterpenoids.

Key words: *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis*, dichloromethane extract, terpenes and sesquiterpenoids, GC-MS, FTIR.

INTRODUCCIÓN

La familia *Bignoniaceae* comprende alrededor de 120 géneros y 800 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales¹; entre ellos se tiene el género *Tecoma*, constituyendo 14 especies de arbustos, crece en toda Latinoamérica²⁻³. En el Perú, se encuentra distribuida en los departamentos de Ica, Arequipa, Tacna y Moquegua; desarrollándose entre 2000 a 3000 m.s.n.m. En la región Arequipa - Perú, hay tres especies: *T. fulva* subsp. *arequipensis*, *T. stans* y *T. sambusifolia*; utilizada en medicina tradicional: como agente antimicrobiano para el tratamiento de algunos tipos de cáncer y forraje del ganado⁴⁻⁵.

El extracto etanólico de las flores de *T. stans* tiene actividad antidiabética, debido a la presencia de los alcaloides tecomina y tecostamina⁶. La literatura científica reporta, que el género *Tecoma* contiene compuestos bioactivos, como: saponinas, glicósidos, flavonoides, alcaloides, aceites esenciales, terpenos, fitoesteroles, antraquinonas, taninos, etc.³⁻⁴.

El aceite esencial de las hojas de *T. smithii* Will, obtenido por hidrodestilación presentan actividad antimicrobiana y antioxidante, determinando sus características fisicoquímicas, fueron identificados los metabolitos secundarios por CG/EM^{1,7-9}. La especie *T. fulva* subsp. *arequipensis* en el Perú, conocida tradicionalmente con el nombre de cahuato o huarango; utilizada en medicina popular para aliviar el dolor estomacal, antiinflamatorio y cicatrización de heridas, además es considerada como planta ornamental, para leña y elaboración de canastas.

El objetivo de la investigación es extraer, separar, purificar e identificar los componentes volátiles orgánicos de *T. fulva* subsp. *arequipensis*, obtenidas por dos métodos y su caracterización fitoquímica fue utilizando fundamentalmente técnicas de CG/EM y FTIR, debido a que no existen antecedentes bibliográficos de la especie en estudio.

PARTE EXPERIMENTAL

Recolección y secado de la muestra

Las hojas y flores del *T. fulva* subsp. *arequipensis* fue recolectada en el distrito de Sogay, región Arequipa a 2600 m.s.n.m. (16°56'75" sur y 71°43'75" oeste) en los meses de abril y mayo del 2017; la muestra fue secada a temperatura ambiente, 20°C por el lapso de siete días. La clasificación taxonómica del vegetal fue realizada en el herbario de UNSA.

Materiales, reactivos y equipos

Todos los reactivos y solventes fueron de grado analítico, cromatofolios de silicagel 60F₂₅₄ de las marcas Merck y Acros. Rotaevaporador marca Buchi modelo R 300, CG/EM; modelo Shimadzu GC-2010, GCROM versión 21000; GC Detector MS serial N° 020524800562 AE ROM VERSIÓN 1,02 Modelo Etapa Dual TMP (Ultra) Fase móvil o gas de arrastre: helio, fase estacionaria: sílica fundida 5 % y 95 % de fenildimetil polisiloxano. Columna: [GC-2010]. Nombre: Rtx-5MS. Espesor: 0,25 µm. Longitud: 30 m. Diámetro interior: 0,25 mm. Temperatura máxima utilizable: 330°C. Inyector: automático.

Refractómetro Abbe. Espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum IR Modelo Frontier versión 10.6.0, en la región del infrarrojo medio comprendida entre 400 y 4000 cm⁻¹. Bomba de vacío de alta presión marca Corning-EEL 852; Vortex marca Labor Muszeripari tipo LE-203.

Para el extracto etanólico se utilizó el CG/EM marca Thermo Scientific Trace™ serie 1300, Pre corrida tiempo: 10,00 minutos tiempo de equilibrio: 0,50 minutos. Inicio de preparación: 0,00 min. Encendido / apagado del horno: Encendido Habilidad criogénica: Apagado Umbral criogénico: 50,0 °C Tiempo de espera criogénico: 60,00 min Temperatura inicial: 100,0 °C Tiempo de retención inicial: 3,00 min Número de rampas: 1 rampa 01 velocidad: 20,0 °C / min Rampa 01 temperatura final: 300,0 °C Rampa 01 tiempo de espera: 20,00 min S / SL - Método frontal Modo S / SL: temperatura sin división habilitada: temperatura activada: 220 °C Habilidad de flujo dividido: Encendido Flujo dividido: 50,0 ml/min Tiempo sin división: 1,50 min Flujo de purga: 5,0 ml/min Purga de tabique constante: En modo

portador: Flujo constante Habilitación de flujo portador: En portador flujo: 1,000 mL/minutos
Compensación de vacío: Activación del ahorrador de gas portador: Flujo del ahorrador de
gas portador: 5,0 mL/minuto Tiempo de ahorro de gas portador: 2,00 minutos Activación
de retrolavado: Tiempo de inicio de retrolavado: 1,50 minutos Tiempo de ejecución del GC
Auxiliar Zonas Método Auxiliar temperatura 1 habilitado: En Auxiliar temperatura 1: 240 °C
Auxiliar temperatura 2 habilitada.

Extracción de los componentes volátiles

Los componentes volátiles orgánicos de hojas y flores frescas de *T. fulva* subsp. *arequipensis*, fueron extraídos por dos métodos: destilación con arrastre de vapor y por maceración en solventes orgánicos. El método de arrastre de vapor se realizó en un equipo tipo Clevenger, la extracción se realizó por triplicado de masa promedio de 180 g, de dos a tres horas. El destilado obtenido, se extrajo con CH_2Cl_2 y éter de petróleo, se secó con Na_2SO_4 anhidro¹³, para luego identificar los compuestos químicos presentes por CCF. Por maceración se utilizó 25 g de hojas y flores de muestra seca por duplicado con 250 mL de solventes, previamente determinando la humedad residual, por el método gravimétrico; los solventes orgánicos empleados fueron: diclorometano, éter de petróleo y etanol. Durante cinco horas diarias con agitación constante con ayuda de un equipo vortex; macerado por cuatro días. El extracto se filtró en papel Whatman N° 1, se concentró en rotaevaporador¹³⁻¹⁴.

Caracterización física y separación por CCF

En el aceite esencial obtenido de la muestra fresca, se realizó la caracterización física: densidad por el método del picnómetro, índice de refracción y la solubilidad en solventes orgánicos, siendo separados sus componentes por CCF en cromatofolios de silicagel, como fase móvil se utilizó acetato de etilo – tolueno (7:93), como agente revelador fue empleado solución de vainillina – H_2SO_4 , se comparó las moléculas orgánicas presentes en el aceite esencial, del vegetal en estudio con los estándares: α -terpineno, p-cimeno, pineno terpinen-4-ol, borneol, timol, mentona y mentol¹⁵.

Identificación y cuantificación de los extractos orgánicos por CG/EM

Para la identificación de los componentes volátiles de los extractos orgánicos por maceración se concentró en rotaevaporador; con los concentrados orgánicos de hojas y flores obtenidos por separado se masó 0,5 g de muestra, aforando en fiola de 10 mL con hexano grado GC. Se depositó en el sonicador por 45 minutos. Filtro el extracto con filtro de jeringa 0,22 μm y colocar directo en el vial de lectura. Para ser analizados en las mismas condiciones por CG/EM, cada uno de los extractos.

Purificación del extracto etanólico por CC y análisis por CG/EM

El fraccionamiento del extracto etanólico de las hojas y flores secas del *T. fulva* subsp. *arequipensis* se realizó por cromatografía en columna (CC) abierta, usando como fase estacionaria silicagel G-200, como fase móvil hexano-acetato de etilo, en diferentes proporciones (9:1; 8:2); fueron separadas las fracciones 1, 3 y 4, concentradas en rotaevaporador para luego determinar e identificar los componentes presentes por CG/EM. Las condiciones de análisis en 200 μL de cada fracción fueron cargados en sendos insertos

para cada vial del autoinyector, la aguja es lavada con una mezcla de metanol-acetato de etilo, antes y después de cada inyección alrededor de 10 veces en total, se carga la jeringa para ser inyectada cuidadosamente, en el equipo Thermo Scientific Trace™ serie 1300 CG/EM.

El equipo GC se encuentra a una temperatura inicial de 60°C en el horno, para operar en split, 1/50; reteniendo ese valor por 3 minutos luego se inicia una rampa de 20 Grd/min. hasta 300°C en el horno de 10 a 15 min, para limpiar la columna capilar. El inyector del GC se estableció a 220 °C, y la línea de transferencia del GC al MS a 240°C. La fuente de iones está a 200°C y se opera a 70 eV, barriendo de los 40 a los 50Da. El gas carrier es helio de alta pureza, el mismo que se encuentra presente dentro del EM, la columna capilar es una OV-5, para EM, de fase químicamente unida y entrelazada al capilar de la misma.

Estos ensayos se realizaron en el Instituto de Investigaciones en Tecnología Química (INTEQUI) de la Universidad Nacional de San Luis Argentina.

Análisis por Espectroscopia FT-IR

Las hojas y flores secas de *T. fulva* subsp. *arequipensis* fueron maceradas en diclorometano por el lapso de tres días con agitación constante, se filtró a vacío haciendo uso de papel filtro Whatman N° 1, el extracto obtenido se concentró en rotaevaporador hasta polvo seco, la muestra se re disolvió en diclorometano; el análisis espectroscópico se realizó utilizando FT-IR, en porcentaje de transmitancia que fue útil para detectar los picos característicos y los grupos funcionales presentes en los extractos purificados, los mismos que fueron registrados e interpretados con tablas espectroscópicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento del aceite esencial por arrastre con vapor de agua de hojas y flores frescas de *T. fulva* subsp. *arequipensis*, fue de 0,40 %, de aspecto resinoso de color blanco, siendo inestable y soluble en agua luego de la extracción; por lo que no se aplicó la técnica de GC/EM, de densidad 0,85 g/mL e índice de refracción 1,464 a 20°C, soluble en etanol absoluto, éter de petróleo y diclorometano.

Para el vegetal con 13 % de humedad residual, se utilizó el método de maceración en solventes orgánicos por cuatro días y concentrado en rotaevaporador, se obtuvieron los siguientes rendimientos: extracto en diclorometano 5,4 %; extracto en éter de petróleo 5,0 % y el extracto en etanol al 98 % fue de 6,2 %¹⁵.

Por CCF de los componentes volátiles de *T. fulva* subsp. *arequipensis*, al ser soluble en agua la resina obtenida se extrajeron los componentes orgánicos en diclorometano y éter de petróleo, de forma cualitativa se pudo identificar, cuatro probables estructuras orgánicas terpenicas, el terpinen-4-ol, *p*-cimeno, mentona y α - pineno (figuras 1 y 2). Los resultados indican que las estructura presentan el factor de retención (RF) similares a los estándares.

Donde:

M1: extracto en diclorometano de hojas.

M2: extracto en diclorometano de flores.

Estándares cromatográficos:

α -terpineno (α T), borneol (B), p-cimeno (PC), α -pineno (α P), timol (T), terpinen 4-ol (T-ol), mentona (M-CO) mentol (M)



α T PC α P M1 T B M2 M T-ol MCO

Figura 1. Cromatograma del extracto de diclorometano de hojas y flores del *T. fulva* subsp. *arequipensis*.

Donde:

M3: Extracto en éter de petróleo de *T. fulva* subsp. *arequipensis* hojas.

M4: extracto en éter de petróleo de *T. fulva* subsp. *arequipensis* flores.

Estándares cromatográficos:

α -terpineno (α T), borneol (B), p-cimeno (PC), α -pineno (α P), timol (T), terpinen 4-ol (T-ol), mentona (M-CO), mentol (M).



α T PC α P M3 T B M4 M T-ol MCO

Figura 2. Cromatograma del extracto etéreo de hojas y flores del *T. fulva* subsp. *arequipensis*.

Analizando las figuras 1 y 2, se observa que hay presencia de moléculas terpénicas, siendo ello coincidente con estudios realizados en aceites esenciales de otras especies vegetales reportando estructuras terpénicas y terpenoides¹⁶⁻¹⁷.

Por la CG/EM del extracto en diclorometano de las hojas fueron identificados 11 compuestos orgánicos (tabla 1 y figura 3), correspondiendo a ocho estructuras de naturaleza terpénica, como el 4-terpineol con 37,45 % de abundancia (tabla 1, figura 3)

Tabla 1. Composición química del extracto en diclorometano de las hojas de *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis*.

Nº	Compuestos químicos	Porcentaje %
1	oct-1-en-3-ol	1,42
2	terpinen-4-ol	37,45
3	2-metilbutanoato de cis hex-3-enil	1,47
4	3,7-dimetilocta-2,6-dieno	1,95
5	(1-prop-1-enil)-2-metoxifenol	13,14
6	octahidropentalen-1-ol	10,28
7	mentol	5,15
8	2,5-diciclopropilpenta-2-en-4-ino	3,09
9	(10Z)-pentadec-10-en-1-ol	8,67
10	germacreno	1,44
11	α -pineno	7,22

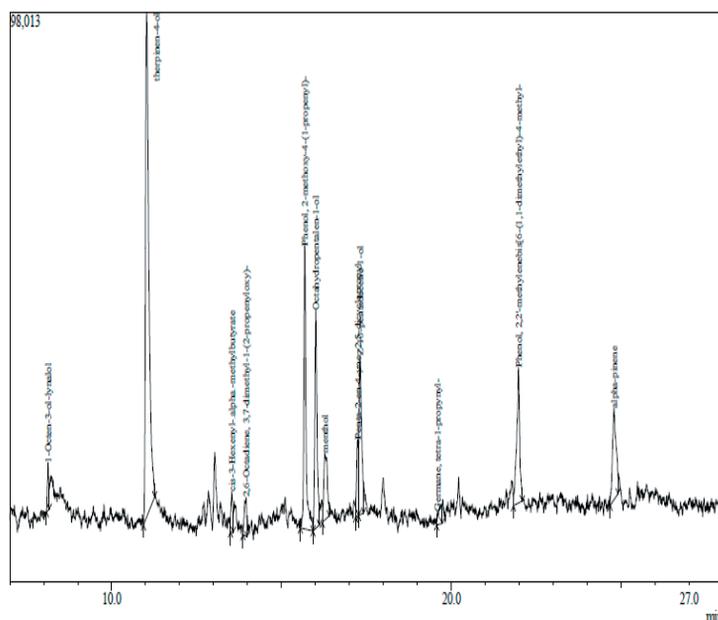


Figura 3. Cromatograma del extracto de hojas de *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis* en diclorometano por GC - MS

En el extracto etéreo de flores se detectó la presencia de 18 compuestos orgánicos, correspondiendo a 13 estructuras de naturaleza terpénica, siendo el compuesto mayoritario fitol con 16,38 % de abundancia (tabla 2, figura 4).

Tabla 2. Composición química del extracto en éter de petróleo de las flores del *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis*.

N°	Compuestos químicos	Porcentaje %
1	2-propilpenten-1-ol	5,0
2	3,7-dimetilocta-1,6-dien-3-ol	2,97
3	nonanal	3,16
4	4,5-dimetilundec-2-eno	2,88
5	1(3-metilbutil)ciclopenteno	4,74
6	2,6,10-trimetildodecano	4,30
7	2,6,11-trimetildodecano	4,14
8	pentadecano	2,99
9	(3E)pentadec-3-en-2-ol	2,97
10	pentadecanal	10,48
11	decan-2-ona	7,25
12	3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol	6,01
13	(2Z,5Z)pentadeca-2,5-dien-1-ol	5,52
14	decano	6,69
15	dodecanoato de-1-metiletilo	3,06
16	2-metilpentadecano	4,31
17	fitol	16,38
18	2,7,10-trimetildodecano	3,05

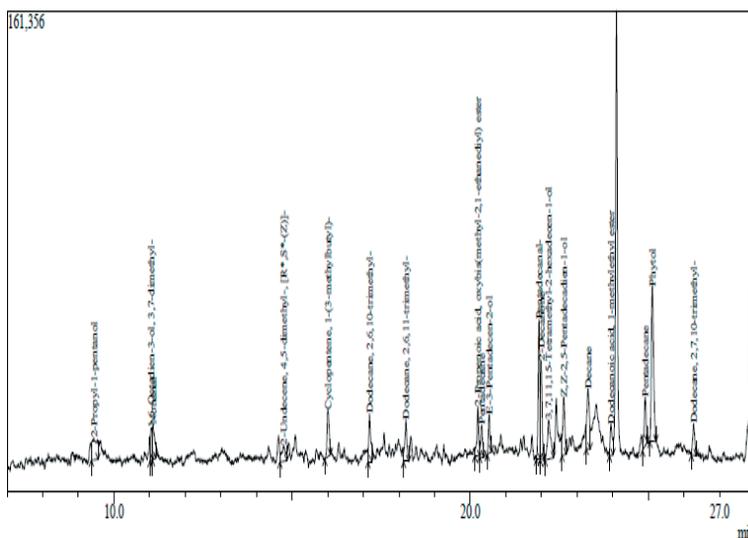


Figura 4. Cromatograma del extracto de flores del *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis* en éter de petróleo por GC-MS

El estudio fitoquímico de otras especies del género, como *T. smithii*, el aceite esencial de hojas frescas presentó 23 constituyentes químicos siendo el fitol el compuesto mayoritario (Kamilia *et al.* 2016); el extracto etanólico del *T. stans* se detectó la presencia de 17 constituyentes químicos, siendo estructuras terpénicas con marcada actividad biológica^{2,18}.

Del fraccionamiento por cromatografía en columna y CG/EM; en la fracción 1 obtenida del extracto etanólico de las hojas de *T. fulva* subsp. *arequipensis* fueron detectados la presencia de 33 constituyentes orgánicos, el esteroide γ -sitosterol, de fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$ y peso molecular 414 g/mol; fue el de mayor abundancia: (50,1 %), el espectro de masas puede ser observado en la figura 5. En la fracción 3 se detectaron la presencia de 33 componentes químicos siendo el ácido hexadecanoico con 52,2 % de mayor abundancia, de fórmula molecular $C_{16}H_{32}O_2$ y peso molecular 256 g/mol, cuyo espectro de masas presentamos en la figura 7. En la fracción 4 se identificaron la presencia de 33 componentes químicos, siendo el 1,3-dihidro-3,3-dimetil-2H-indol-2-ona con 36,1 % el de mayor abundancia, de fórmula molecular $C_{10}H_{11}NO$ y peso molecular 161 g/mol lo que se observa en la figura 8.

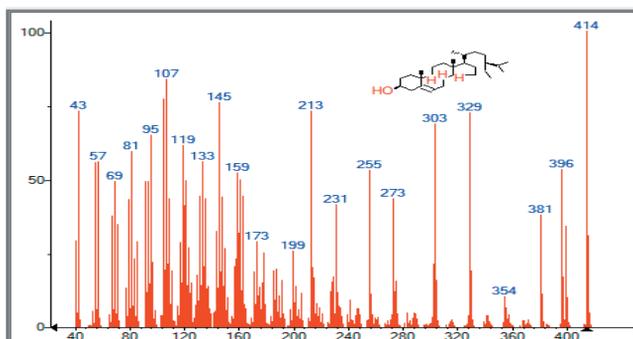


Figura 5. Espectro de masas del γ -sitosterol en la fracción 1, del extracto en etanol de hojas del *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis*.

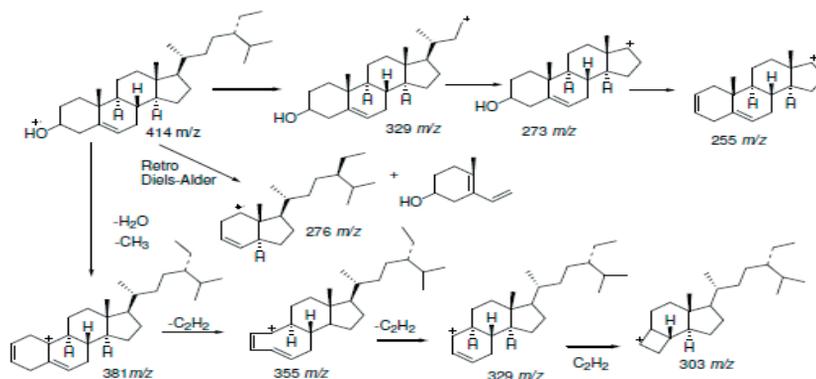


Figura 6. Fragmentación propuesta para el γ -sitosterol (cortesía de Peniche H. pag. 58, 2016).

En la figura 6 se observa que a partir de la formación del ión molecular 414 m/z, se genera la fragmentación típica del γ -sitosterol con una insaturación Δ^5 , los fragmentos 329 m/z y 303 m/z, además de la pérdida de metilos, el -OH de la posición C-3 y carbonos de la cadena lateral; a través de pérdidas consecutivas de etino (C_2H_2)¹⁹.

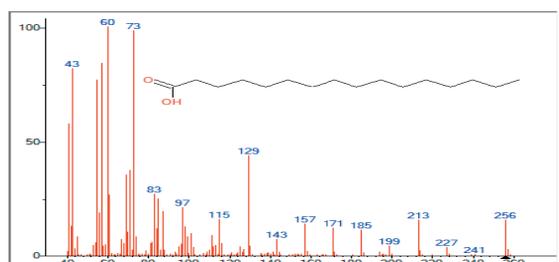


Figura 7. Espectro de masas del ácido hexadecanoico en la fracción 3, del extracto en etanol de hojas del *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis*.

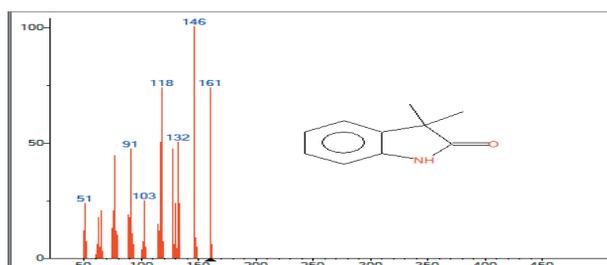


Figura 8. Espectro de masas del 1,3-dihidro-3,3-dimetil-2H-indol -2-ona en la fracción 4, del extracto en etanol de hojas del *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis*.

La identificación de los componentes químicos en las fracciones fue realizada por comparación con la base de datos de los espectros de masas de la biblioteca científica. Mass Spectral Libraries (NIST 17 and Wiley Libraries) 2014.

Los resultados de los espectros FTIR, los picos detectados y las funciones orgánicas correspondientes al extracto de diclorometano de flores se muestran en la figura 9 y tabla 3 y de las hojas se muestran en la figura 10 y tabla 4 de *T. fulva* subsp. *arequipensis*.

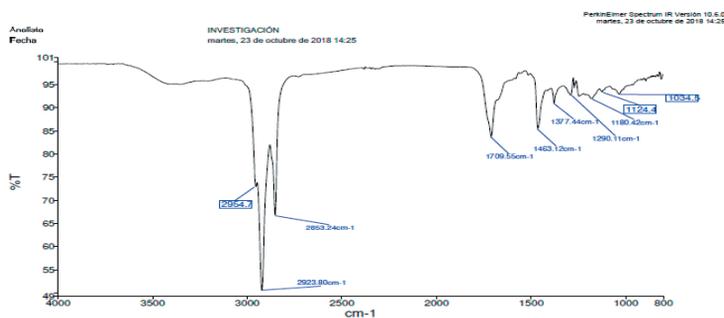


Figura 9. Espectro FTIR del extracto en diclorometano de flores de *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis*.

Tabla 3. Espectro FTIR del extracto en diclorometano de flores de *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis*.

N° pico	$\tilde{\nu}$ cm ⁻¹	Vibración del grupo funcional	Función orgánica
A	3500	O-H, N-H	alcoholes, fenoles, ácidos y aminas
B	2923	C-H	hidrocarburos saturados: alcanos
C	2853	C-H	alcanos
D	1709	C=O	cetonas α,β insaturadas, ácidos, ésteres
E	1463	-CH ₂ -	metilenos de alcanos
F	1377	-CH ₃	metilos de alcanos
G	1290-1034	C-C, C-O, C-N	huella dactilar: alcanos, éteres, aminas

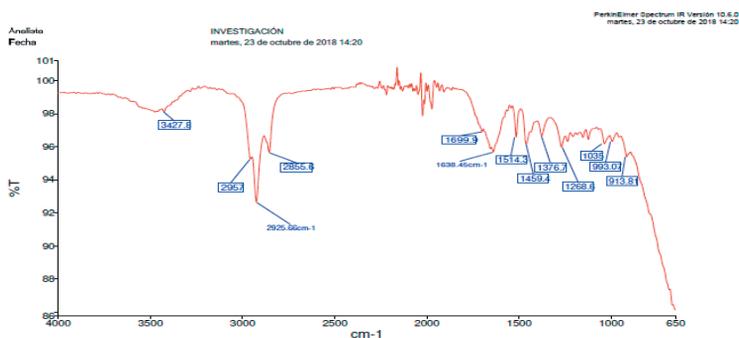


Figura 10. Espectro FTIR del extracto en diclorometano de hojas de *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis*.

Tabla 3. Espectro FTIR del extracto en diclorometano de hojas de *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis*.

Nº pico	$\bar{\nu}$ cm ⁻¹	Vibración del grupo funcional	Función orgánica
A	3427	O-H, N-H	alcoholes, fenoles, ácidos y aminas
B	2925	C-H	hidrocarburos saturados: alcanos
C	2855	C-H	alcanos
D	1699	C=O	cetonas α,β insaturadas, ácidos, ésteres
E	1638	C=C	hidrocarburo insaturado: alquenos
F	1514	C=C	hidrocarburo aromático
G	1459	-CH ₂ -	metilenos de alcanos
H	1376	-CH ₃	metilos de alcanos
I	1298-913	C-C, C-O, C-N	huella dactilar: alcanos, éteres, aminas

La detección de los constituyentes químicos de los extractos en diclorometano de hojas y flores del *T. fulva* subsp. *arequipensis*, verificada por la técnica de FTIR, se encontró grupos funcionales característicos como: fenoles solamente en hojas, cuyas bandas de absorción son 1638 y 1514 cm⁻¹, mientras en las flores se encuentran alcoholes secundarios, en ambos extractos se encuentra el grupo carbonilo especialmente de cetonas α, β insaturadas, ácidos carboxílicos y ésteres, entre las bandas de absorción de 1699 y 1709 cm⁻¹, en las bandas de absorción 3427 y 3500 cm⁻¹ se detecta la presencia del grupo hidroxilo y amino; las estructuras orgánicas detectadas también se confirman con el análisis de los espectros obtenidos por GC-MS10-12.

CONCLUSIONES

Por extracción y caracterización física en la *T. fulva* subsp. *arequipensis* se comprobó la presencia de componentes orgánicos volátiles solubles en solventes de baja polaridad.

Por cromatografía CG/EM, del extracto diclorometánico y etéreo se identificó terpenos y terpenoides.

Por cromatografía en columna y CG/EM del extracto etanólico de hojas en la fracción 1, se identificó γ -sitosterol, en la fracción 3 se identificó ácido hexadecanoico y en la fracción 4 se identificó 1,3-dihidro-3,3-dimetil-2H-indol-2-ona, siendo los componentes orgánicos de mayor abundancia en cada fracción.

En los espectros de FTIR de los extractos del *T. fulva* subsp. *arequipensis*, se confirma la presencia de alcoholes, compuestos carbonílicos, hidrocarburos aromáticos, fenoles y aminas.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa y UNSA Investiga, por su apoyo económico en la subvención del proyecto seleccionado “Estudio fisicoquímico, biológico y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis* (cahuato)”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taha KF, El-kashoury EA, Ezzat SM, Saleh NA. Antimicrobial and antioxidant activity of volatile constituents of the leaves of *Tecoma smithii* Will Wats. Global Journal of Medical Plant Research. Glob J Med Plant Res. 2016; 4(4): 16-22.
2. Anburaj G, Marimuthu M, Rajasudha V, Manikandan R. Phytochemical screening and GC-MS analysis of ethanolic extract of *Tecoma stans* (Family Bignoniaceae) Yellow Bell Flowers. J Pharmacogn Phytochem. 2016; 5(4): 172-175.
3. Sundas I, Zaheer K, Rizwana R, Anjum P. Evaluation of antibacterial activity of leaf extracts of *Mansoa alliacea* (Lam.) A: H. Gentry, *Tecomaria capensis* (Thumb) Space and *Tecoma stans* (L) Juss Ex. H. B. And K. J Biodivers Environ Sci. 2016; 9(1): 69-75.
4. Salem M, Gohar M, Camacho L, El Shanhorey N, Salem A. Antioxidant and antibacterial activities of leaves and branches extracts of *Tecoma stans* (L) Juss ex Kunth against nine species of pathogenic bacteria. Afr J Microbiol Res. 2013; 7(5): 418-426.
5. Dash S, Das C, Sahoo D, Sahoo A. Phytochemical composition anti-inflammatory and analgesic activities of *Tecoma stans* Linn. (Bignoniaceae). Nat Pharm. Technol. 2011; 1(2): 5-8.
6. Vidhya R, Fleming T. Assessment of the Cytotoxic Potential of *Tecoma castanifolia* (D. Don) Melch Flower Extract Again MCF-7 Cell Line. AJEthno. 2016; 3(1): 001-005.
7. Joselin J, Sarasabai T, Rajam A, Jeeva S. Phytochemical evaluation of bignoniaceae flowers. J Chem Pharm Res. 2013; 5(4): 106-111.
8. Sowjanya P, Srinivas P. Phytochemical investigation and antimicrobial properties of crude flower extract of *Tecoma stans* (L) juss. Ex. Kunth. Der Pharm Lett. 2017; 9(7): 24-34.
9. Sunitha K. Preliminary phytochemical investigations and immune modulatory screening of methanol extract of *Tecoma stans* leaves. J Chem Pharm Res. 2018; 10(7): 151-155.
10. Sandosh T, Paul M, Yesu J. Phytochemical analysis of *Stylosanthes fructicosa* using UV-VIS, FTIR and GC-MS. Res J Chem Sci. 2013; 3(11):14-23.
11. Kumar K, Prasad D. Identification and comparison of biomolecules in medicinal plants of *Tephrosia tinctoria* and *Atylosia albicans* by using FTIR. Rom J Biophys. 2011; 21(1): 63-71.
12. Kalaichelvi K, Dhivya S. Screening of phyto constituents, UV-VIS spectrum and FTIR analysis of *Micrococca mercurialis* (L) Benth. Int J Herb Med. 2017; 5(6): 40-44.
13. Rodríguez M, Alcaraz M. Procedimiento para la extracción de aceites esenciales de plantas aromáticas. Centro de investigaciones biológicas del noreste S. C. La Paz, Baja California. México: Proyecto SAGARPA. CONACYT 126183; 2012.

14. Rajamurugan R, Thirunavukkrasu C, Sakthivel V, Sivashanmugam M, Rghavan C. Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial activities of ethanolic extract of *Tecoma stans* flowers. *Int J Pharma Bio Sci.* 2013; 4(2): 124-130.
15. Ochoa K, Paredes L, Bejarano D, Silva R. Extraction characterization and evaluation of antibacterial activity of essential oil of *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). *Scientia agricultural.* 2012; 3: 291-302.
16. Travati G, Cherice G, Sanchez E, Galhiane M. Essential oil composition of *Aloysia gatissima* from Brazil. *J Essent Oil Res.* 2009; 21: 325-326.
17. Essam F, Maytham H. Extraction and purification of terpenes from nutmeg (*Myristica fragrans*). *J Al-Nahrain Univ.* 2012; 15(3):151-160.
18. Wang Y, Li X, Jiang Q, Son H, Chen S, Guam D *et al.* GC-MS analysis of the volatile constituents in the leavers of 14 compositae plants. *Molecules.* 2018. 23(1): 166. doi: 10.3390/molecules23010166.
19. Peniche H. Identificación de compuestos leishmanicidas en el rizoma de *Dorstenia contrajerva*. [Tesis de Maestro en Ciencias]. Mérida, México. Centro de Investigación Científica de Yucatán; 2016.

DISTRIBUCIÓN DE ARSÉNICO EN AGUA SUPERFICIAL Y SEDIMENTO EN LA CUENCA DEL RÍO CARRIZAL, MANABÍ - ECUADOR

Ana María Aveiga Ortiz^a, Patricio Javier Noles Aguilar^a, Fabián Peñarrieta Macías^a,
Erika Murgueitio Herrera^b

RESUMEN

En diversas fuentes naturales de agua superficial de Ecuador, así como en otras a nivel mundial, la concentración de arsénico supera los límites permisibles (10 µg/L) establecidos por la Organización Mundial de la Salud. El objetivo de la presente investigación fue determinar los niveles de arsénico en agua superficial y sedimentos en la cuenca del río Carrizal (Manabí, Ecuador), zona que posee una importante actividad agropecuaria. Se monitorearon 21 estaciones en tres zonas, cubriendo una extensión de 51 km. Las concentraciones de arsénico en agua y sedimento se evaluaron mediante espectrometría de absorción atómica con el equipo PerkinElmer® AAnalyst™ 200, de acuerdo con los lineamientos del Standard Methods Edición 2015, por la metodología APHA AWWA WEF 3114-B. Se utilizó el diseño experimental de bloques al azar, con arreglo factorial de las tres zonas de muestreo. Los resultados indican que se encontraron concentraciones de arsénico de hasta 35,64 mg/L en agua superficial y de 47,41 mg/kg en sedimentos. Se concluye que estos altos niveles de arsénico en la cuenca del río Carrizal podrían ser de origen antrópico.

Palabras clave: microcuenca, subcuenca, embalse La Esperanza, contaminación.

ARSENIC DISTRIBUTION IN SUPERFICIAL WATER AND SEDIMENT AT THE CARRIZAL RIVER BASIN, MANABI-ECUADOR

ABSTRACT

In various natural sources of surface water in Ecuador, as well as in others worldwide, the concentration of arsenic exceeds the permissible limits (10 µg / L) established by the World Health Organization. The objective of these investigation was to determine the levels of arsenic in surface water and sediments in the Carrizal river basin (Manabí, Ecuador), an area

a Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Carrera de Ingeniería Ambiental, Calceta, Manabí, Ecuador, aaveiga@espam.edu.ec

b Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Departamento de Ciencias de la Tierra y la Construcción

that has an important agricultural activity. 21 stations in three areas were monitored, covering an area of 51 km. Arsenic concentrations in water and sediment were evaluated by means of atomic absorption spectrometry with the PerkinElmer® AAnalyst™ 200 kit, in accordance with the guidelines of Standard Methods Edition 2015, by the APHA AWWA WEF 3114-B methodology. The experimental design of random blocks was applied, with a factorial arrangement of the three sampling areas. The indicated results are found for arsenic of up to 35,64 mg / L in surface water and 47,41 mg / kg in sediments. It is concluded that these high levels of arsenic in the Carrizal river basin could be of anthropogenic origin.

Key words: Micro basin, sub-basin, La Esperanza Reservoir, contamination.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, se estima que más de un millón de especies contaminantes son introducidas en fuentes de agua a través de vertidos antropogénicos; de allí que, los estudios de calidad de las cuencas hidrográficas han adquirido gran interés en las últimas décadas dado el incremento de la población en sus riberas, el creciente grado de industrialización y aportes del sector primario¹. Los metales pesados como el arsénico (As) en aguas y sedimentos se caracterizan por ser extremadamente tóxicos, altamente persistentes y de rápida acumulación por los organismos^{2,3}. En México, Argentina, Chile, Perú y Nicaragua, el arsénico (As) en el ambiente y en las fuentes de agua para consumo humano es debido a factores geológicos; aunque, las actividades antropogénicas como explotación minera, refinación de metales por fundición, procesos electrolíticos para producción de metales como cadmio y zinc también contribuyen a incrementar el contenido de este metal en el ambiente⁴.

Las formas solubles del As como el ácido metilarsónico (MMA) y el ácido dimetilarsónico (DMA) son fuertemente tóxicas, la ingestión de dosis elevadas causa problemas gastrointestinales, cardiovasculares, disfunciones del aparato nervioso, y finalmente a la muerte^{1,5}. En general, las formas inorgánicas son más tóxicas que las orgánicas, y el arsenito es más peligroso que el arsenato⁶. En Argentina, se detectaron niveles de As en aguas subterráneas entre 20 y 4600 µg/L. Además, en el mismo país se constató que durante el periodo 2010-2016, tanto para los efectos carcinogénicos y no carcinogénicos, las concentraciones de As presentan alto riesgo al superar los umbrales máximos en la población de Las Flores⁷.

En Ecuador, se ha encontrado que el contenido de elementos riesgosos, entre ellos As, en aguas, sedimentos y peces en la cuenca del río Santiago (Esmeraldas), superan los valores permisibles, con rangos de afectación biológica en la mayoría de las estaciones de muestreo; exhibiendo niveles de contaminación moderados⁸. En función de la problemática generada por la presencia de metales pesados, específicamente As, y ante la imperativa necesidad de plasmar un plan de gestión para el manejo de fuentes hídricas, se presenta el caso del río Carrizal (Manabí-Ecuador), de donde se exponen resultados sobre la presencia y distribución de arsénico tanto en el agua superficial como en sedimentos.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Área de muestreo

El estudio se realizó en la cuenca hidrográfica del río Carrizal (Cantón Bolívar, Manabí); cuenca comprendida entre las coordenadas 1 4'15" S, 79 52'12" W, con un área de aproximadamente 1 390 km², la cual se ubica en la provincia Manabí y limita al norte con las cuencas del río Briceño y río Jama, al sur con las cuencas del río Portoviejo y río Guayas, al este con el Océano Pacífico y la cuenca del Estero Pajonal y, al oeste con la cuenca del río Guayas⁹.

De acuerdo a las características hidrológicas, geológicas, climatológicas, actividades antropogénicas y de uso del suelo, y a criterios de identificación, accesibilidad y representatividad del objetivo de estudio, se establecieron 21 estaciones de monitoreo a lo largo de la subcuenca del río Carrizal, distribuidas de la siguiente manera: 7 estaciones en la microcuenca (17 km de extensión), 5 estaciones en el embalse La Esperanza (8 km de extensión) y 9 estaciones distribuidas en 26 km en la subcuenca del río Carrizal, con lo cual se cubrió una extensión total de aproximadamente 51 km (figura 1). El estudio se dividió en las siguientes zonas:

- **Zona 1** (Microcuenca): Severino, Balsa en Medio, Tigre Adentro, Río Chico, Puente Carrizal, El Frutal.
- **Zona 2** (Embalse La Esperanza): Carrizal, Bejuco, Dos Bocas, Membrillo, Embalse La Esperanza
- **Zona 3** (Subcuenca): Quiroga, La Esperanza, Barranco Colorado, Sarampión, Mata Palo, Los Almendros, San Bartolo, La Karina, Limón.

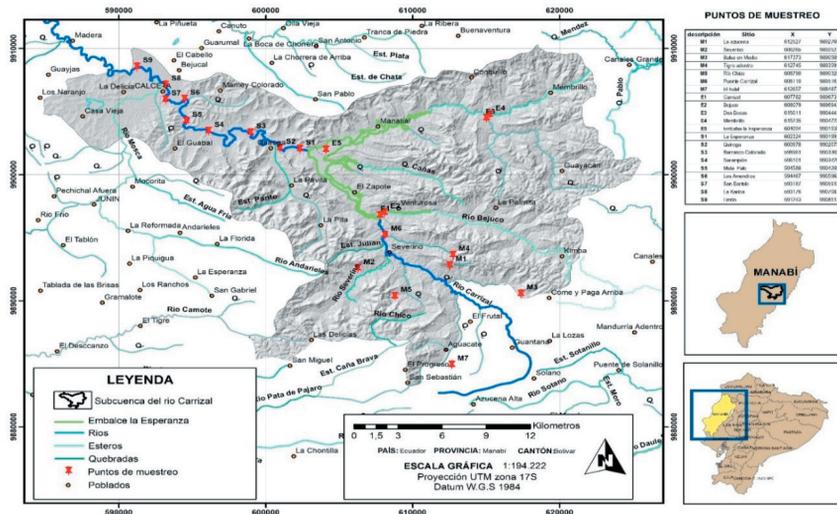


Figura 1. Croquis de la cuenca hidrográfica del río Carrizal en la República del Ecuador.

2. Toma de muestras de aguas y sedimentos

De acuerdo al régimen unimodal de distribución de las precipitaciones de la zona en estudio, los muestreos se realizaron dos veces al año, durante los meses de agosto y octubre, correspondientes a un periodo de caudal medio y al caudal de estiaje, respectivamente⁹. El protocolo para toma, conservación y manipulación de las muestras de agua, se tomó como referencia a UNE-EN ISO 5667-3:2019 y a Murgueitio *et al.* (2018), con adaptaciones de acuerdo a las necesidades del proyecto. Se tomó una muestra superficial, lo más cercano al centro del cuerpo de agua y en contra de la corriente al flujo del recurso hídrico; estas muestras fueron colectadas con una botella muestreadora de fondo horizontal¹⁰. Para el análisis de arsénico, las muestras fueron acidificadas con HNO₃ 0,1 N con pH de 3,0 a 4,0 y refrigeradas a 4,0°C para su conservación desde el momento de la recolección¹¹.

Para la recolección de las muestras de sedimentos se tomó como referencia a Murgueitio *et al.* (2018), y en cada estación de muestreo se tomó aproximadamente un kilogramo de sedimento superficial a la profundidad de 25 - 50 cm, colectados desde la orilla del río, con un barreno; colocadas en bolsas plásticas con cierre hermético, y conservadas a 4,0°C¹⁰. En el Embalse La Esperanza, la recolección se realizó a una profundidad de 7 a 33 m con el apoyo de una draga tipo Van Veen de acero inoxidable, lanzada desde una barca¹⁰.

3. Determinación de arsénico

Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Medio Ambiente, Departamento de Ciencias de la Tierra y de la Construcción de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE).

1. Equipos, materiales y reactivos

a. Equipos y materiales

- a) Espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer® AAnalyst™ 200, con generador de hidruros (límite de detección de 0,15 µg/L) equipado con el quemador para llama de aire-acetileno y con la celda de cuarzo colocada en el soporte del quemador.
- b) Lámpara de As de cátodo hueco

b. Reactivos

- a) Ácido clorhídrico (0,200 µg/L), b) Hidróxido de sodio (0,25 mol/L), c) Tetrahydroborato de sodio (0,8 mol/L), d) Argón, disponible comercialmente. e) Solución de Ioduro de Potasio: Disolver 3 g de KI y 5 g de L(+)-Ácido ascórbico en 100 mL de agua desionizada,
- b) Soluciones de As. La solución stock contiene 1000 mg/L de As.

Para elaborar las curvas de calibración, se utilizó una réplica, con un tiempo de integración de diez (10) segundos.

c. Descripción

El arsénico es convertido en hidruro mediante reacción con el borohidruro de sodio y se transporta dentro de atomizador de absorción atómica. Los hidruros son depurados continuamente con argón dentro de la celda de cuarzo calentada por la llama del espectrómetro de absorción atómica y convertidos a átomos en fase gaseosa.

d. Condiciones recomendadas para el uso del equipo Perkin Elmer AA200

Estas condiciones son dadas por el manual de uso del equipo, para el As.

Longitud de onda 193,70 nm; ranura 0,7 nm; ruido relativo 1; concentración característica 0,1 µg/L; concentración característica de chequeo 5 µg/L; rango lineal a 5 µg/L; flujo de oxidante 10 L/min Arsénico flujo de acetileno 3,3 L/min.

4. Análisis estadístico

Se utilizó el diseño experimental completamente aleatorizado, con arreglo factorial de los tratamientos, donde los factores correspondieron a las zonas de muestreo (microcuenca, embalse y subcuenca) y los meses (agosto y octubre), mientras que las repeticiones estuvieron representadas por las estaciones de muestreo.

Previo al análisis de varianza (ANOVA), los valores de las características cuantificadas relacionadas a las concentraciones de As tanto en agua como en sedimentos fueron examinados por las pruebas de normalidad de Wilk-Shapiro y la de homogeneidad de varianza de Bartlett por el programa ASSISTAT Versión 7.7 (2016)¹². Hubo necesidad de transformar los datos en raíz cuadrada de $(X+1)$ para satisfacer supuestos del ANOVA. Todos los análisis se realizaron con el software estadístico InfoStat®¹³.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la Zona 1 (microcuenca que consta de los puntos de monitoreo Severino, Balsa en Medio, Tigre Adentro, Río Chico, Puente Carrizal, El Frutal) se encontró que las concentraciones de As en sedimento fueron menores a 0,001 mg/kg y en agua van desde no detectable por el equipo hasta 23,05 mg/L (figura 2). Resultados similares se obtuvieron en las provincias de Guayas y Los Ríos (Ecuador) donde las concentraciones de As disuelto (en aguas de riego, ríos y de pozo) fueron inferiores a 10 µg/L; sin embargo, en el sitio de Taura, los valores oscilaron entre 12 y 19 µg/L¹⁴.

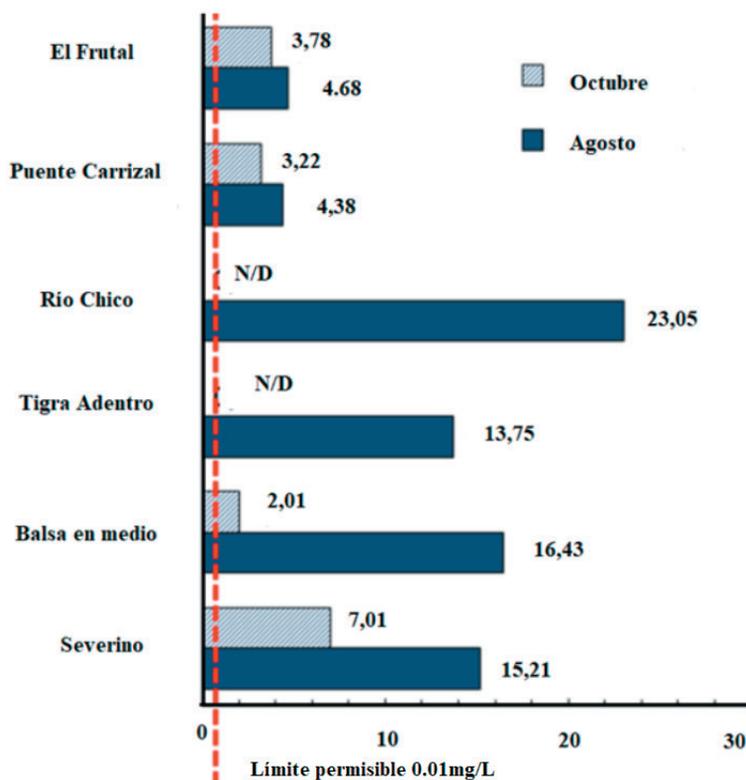


Figura 2. Zona 1 (microcuenca): variación de las concentraciones de arsénico en µg/L en agua durante los meses de muestreo.

Concentraciones relativamente bajas de arsénico disuelto en agua también sugieren una atenuación del arsénico en sedimentos más profundos, lo cual se atribuyó a cambios en las condiciones REDOX a lo largo de la cuenca asociada a la planicie Chianan (Taiwán) y a las interacciones con el Mn y el Fe depositado en el perfil de sedimentos, que funciona como una barrera de atenuación¹⁵.

Para la Zona 2 (Embalse La Esperanza: Carrizal, Bejuco, Dos Bocas, Membrillo, Embalse La Esperanza) se presentan las concentraciones de As en la figura 3, siendo los niveles en el sedimento menores al límite detectable por el equipo, y en agua varían desde no detectable por el equipo hasta 20,11 mg/L. El As interactúa con diferentes tipos de sedimentos y condiciones ambientales a lo largo de los ríos y arroyos; por lo tanto, el As acuoso y extraíble de los sedimentos depende de la ubicación geográfica, en el norte de Ecuador, los ríos de El Ángel, San Pedro y Pichan y Quebradas Cachiyacu y Rumihuaycu tienen un contenido de arsénico muy diverso de 974 µg/L a 2 µg/L¹⁶.

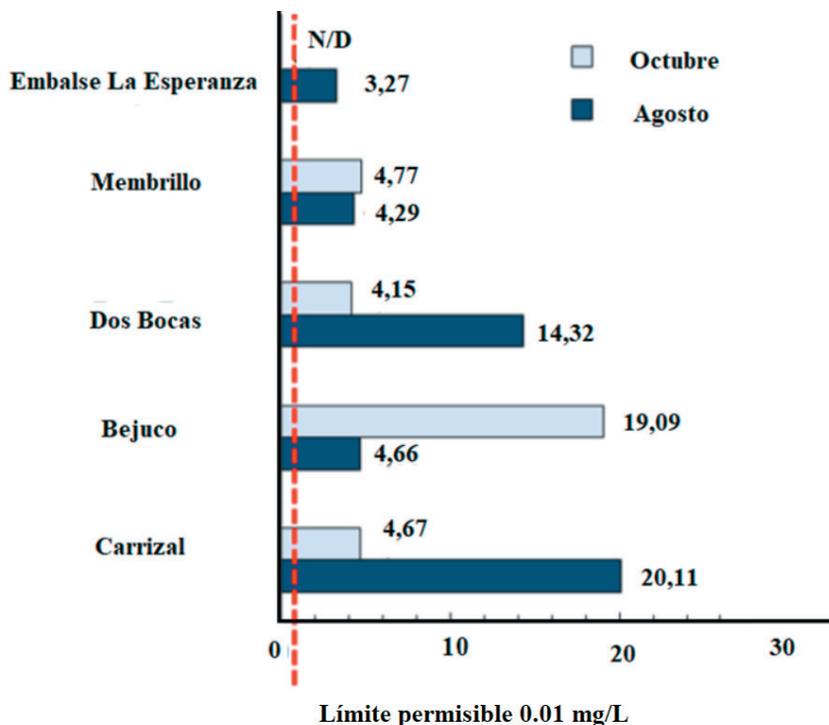


Figura 3. Zona 2 (Embalse La Esperanza): variación de las concentraciones de arsénico en µg/L en agua durante los meses de muestreo.

Para la Zona 3 (Subcuenca: Quiroga, La Esperanza, Barranco Colorado, Sarampión, Mata Palo, Los Almendros, San Bartolo, La Karina, Limón) se encontró los niveles de As en agua y sedimento que se muestran en la figura 4. Las concentraciones en agua llegan a un máximo de 35,64 mg/L y en sedimentos hasta 47,41 mg/kg. En la laguna Limoncocha - Ecuador el agua no presenta valores significativos de As, pero en sedimentos hay concentración de hasta 1,3 mg/kg de As, por lo que probablemente este elemento debe estar en una forma química que dificulta su solubilidad¹⁷.

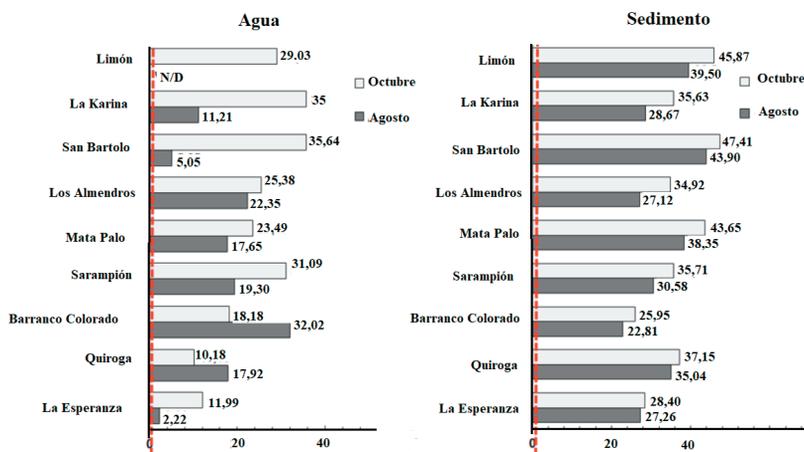


Figura 4. Zona 3 (Subcuenca): variación de las concentraciones de arsénico en ppm tanto en agua y sedimento durante dos meses de muestreo.

Se reporta el coeficiente de distribución del arsénico entre el sedimento y el agua superficial para las tres zonas de monitoreo. Este coeficiente fue calculado en base a las concentraciones de As en la fase sólida (sedimento) y en la fase líquida (agua superficial), según la siguiente ecuación:

$$K_d = \frac{\text{Concentración Arsénico en sedimento (mg/kg)}}{\text{Concentración Arsénico en agua (mg/L)}}$$

Valores relativamente bajos de K_d indican que el arsénico tiene mayor grado de disolución en la fase acuosa (figura 5); mientras que, valores altos de K_d indican mayor preferencia del arsénico por la fase sólida (sedimento). La movilización o distribución del arsénico está sujeta a cambios y transformaciones biogeoquímicas, así como a la desorción en acuíferos, debido a cambios de pH o reacciones REDOX. Además, existe asociación con actividades microbianas, que inducen un ambiente reductor. También, la distribución o partición del arsénico se debe a la desorción por competencia iónica con fosfatos, nitratos, carbonatos y silicatos^{18, 19, 20, 21, 22}.

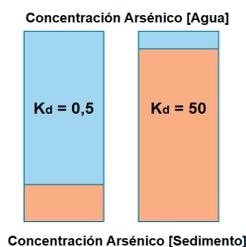


Figura 5. Coeficiente de distribución del arsénico en agua superficial y sedimento.

En la figura 6, según los resultados de caracterización para la Zona 1 -Microcuenca- dado los valores bajos del coeficiente de partición K_d , el arsénico tiene mayor disolución en el agua superficial que preferencia por el sedimento, para los dos meses monitoreados. Este efecto ya ha sido reportado²³, en estudios de la cuenca del Río Rojo que nace en las montañas de la provincia de Yunnan, en China y discurre hacia el sudeste atravesando el territorio norte de Vietnam, en donde que las concentraciones más altas de arsénico ocurrieron en la transición de la temporada de lluvias a la estación seca y las más bajas al final de la estación seca, lo cual se debe a variaciones en las condiciones redox debido a niveles fluctuantes de las aguas subterráneas que indujeron la liberación de As a la fase líquida a través de mecanismos reductores u oxidativos. Las variaciones a largo plazo y estacionales en las concentraciones de As en el agua tienen implicaciones importantes con fines epidemiológicos, ya que sirven de referencia para la reducción de incertidumbre en la estimación de riesgos a la salud por exposición al contaminante y para diseñar estrategias de mitigación de impactos a través del descarte de aguas de mayor riesgo y explotación de recursos hídricos donde las concentraciones se mantengan en niveles aceptables²⁴.

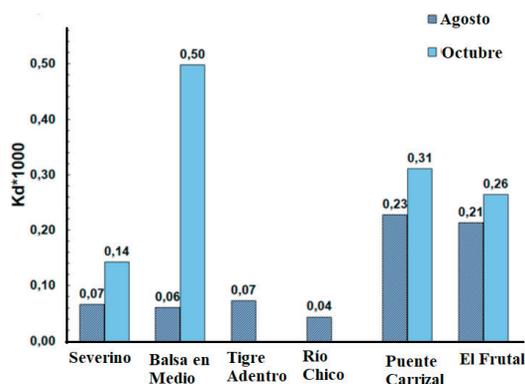


Figura 6. Coeficiente de distribución sedimento-agua para la Zona 1 (Microcuenca) de las concentraciones de arsénico durante dos meses de muestreo.

La caracterización para la Zona 2 -Embalse- indica que el As tiene mayor disolución en el agua superficial que preferencia por el sedimento, asimismo, para los dos meses monitoreados, dado los valores bajos del coeficiente de partición K_d , salvo en el mes de octubre en el punto de muestreo Embalse La Esperanza. Es decir, en el mes de octubre en este punto del embalse la concentración de arsénico fue mayor en el sedimento que en la muestra de agua superficial, en contraste con los otros puntos de monitoreo.

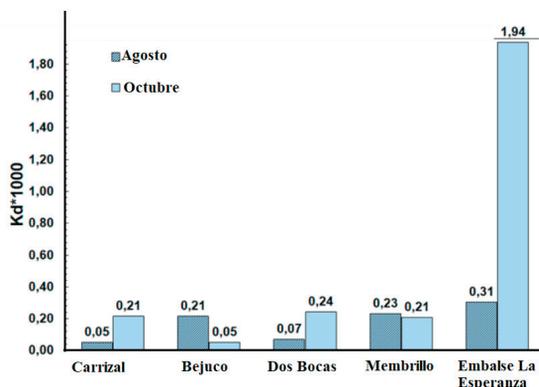


Figura 7. Coeficiente de distribución para la Zona 2 (Embalse La Esperanza) de las concentraciones durante dos meses de muestreo.

En la subcuenca del río Carrizal (Zona 3), el mayor coeficiente de distribución de la concentración de arsénico en los sedimentos, fue en el sector de La Esperanza y de San Bartolo durante los meses de monitoreo, como se indica en la figura 8.

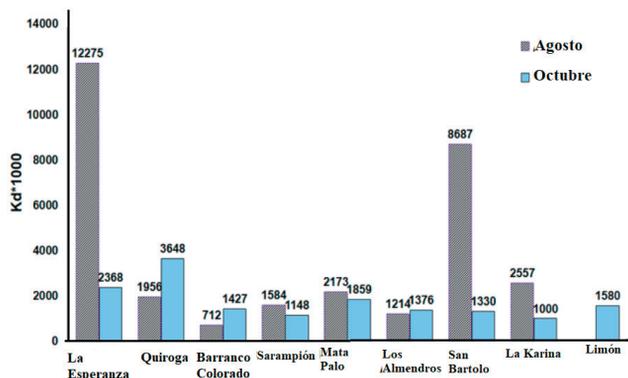


Figura 7. Coeficiente de distribución para la Zona 3 (Subcuenca) de las concentraciones de arsénico durante los meses de muestreo.

Se determinó la diferencia estadística entre dos variables: zona de muestreo (Zonas 1, 2 y 3), y los meses de muestreo (agosto y octubre) para las muestras de agua y sedimento, respectivamente (figuras 9 y 10). En las tres zonas evaluadas de la cuenca del río Carrizal, durante el mes de agosto no mostraron diferencias estadísticas entre sí; sin embargo, durante el mes de octubre, los niveles de As en la Zona 3 (Subcuenca) fueron superiores estadísticamente a los cuantificados en la Zona 2 (Embalse) y la Zona 1 (Microcuenca), los cuales resultaron similares entre sí. Las concentraciones encontradas de As no responden a un origen geológico, tal como se ha encontrado en otros estudios⁴; por ende, se afianza la hipótesis de que el arsénico aquí reportado procede de deposiciones antrópicas de la zona.

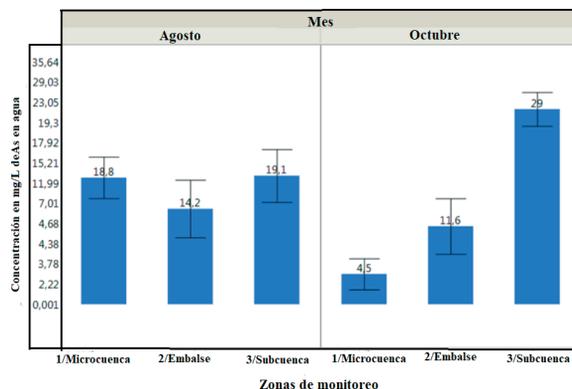


Figura 9. Variaciones de las concentraciones de arsénico en el agua superficial en tres zonas y dos meses de muestreo en la cuenca del río Carrizal (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey a 5 % de probabilidad).

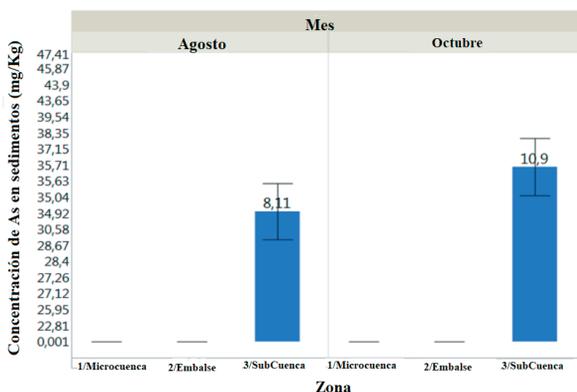


Figura 10. Variaciones de las concentraciones de arsénico en el sedimento en tres zonas y dos meses de muestreo en la cuenca del río Carrizal (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey a 5 % de probabilidad).

De acuerdo al análisis de varianza (tabla 1), se observaron diferencias altamente significativas para las tres zonas de muestreo, tanto para la concentración de As en agua como en sedimento. De manera similar, se verificó diferencia significativa para la interacción entre las dos variables estudiadas (zona de muestreo y meses de muestreo). La comparación de las concentraciones de As en sedimentos por la prueba de Tukey a 5% de probabilidad (tabla 2) indica que a nivel de la Zona 3 (Subcuenca) los valores promedio de arsénico fueron estadísticamente superiores a los obtenidos tanto para la Zona 1 (Microcuenca) como para la Zona 2 (Embalse La Esperanza), siendo que estos dos últimos son similares entre sí.

Tabla 1. Resumen del análisis de varianza para la variable concentraciones de arsénico en sedimentos y aguas en la cuenca del río Carrizal.

Fuente de Variación	Gl	Cuadrados medios			
		Datos observados		Datos transformados $(X+1)^{0,5}$	
		Sedimentos	Aguas	Sedimentos	Aguas
Zona	2	6 023,66**	758,76**	121,77**	14,57**
Meses	1	22,16	20,54	0,15	1,78
Zonas x Meses	2	26,21	329,45**	0,18	7,23**
Error	34	24,22	61,47	0,17	1,12
CV (%)		31,35	58,28	12,76	30,17

** Diferencias altamente significativas ($p < 0,01$)

Tabla 2. Comparaciones de los valores promedios de arsénico en sedimentos en tres zonas de la cuenca del río Carrizal.

Zona	Concentraciones de arsénico		Ámbito estadístico
	Observados	Transformados	
Subcuenca	34,885	5,96	A
Microcuenca	0,001	1,00	B
Embalse	0,001	1,00	B

Medias seguidas de la misma letra no difieren entre sí (Tukey a 5 % de probabilidad)

Se han identificado cinco mecanismos naturales de contaminación de fuentes naturales debido al arsénico: actividad volcánica o hidrotermal; meteorización oxidativa de sulfuros arsénicos, típicamente pirita y arseno-pirita; desorción de As desde superficies minerales a pH alto; reducción de oxi-hidróxidos de hierro sedimentario y concentración evaporativa¹⁶. La presencia de As en aguas de consumo humano en ciertos ríos de México, Nicaragua, Perú, Argentina y Chile e incluso Ecuador^{5,6,8,16} se atribuye a factores geológicos; sin embargo, en el caso de la cuenca del Río Carrizal, no se han reportado ninguno de estos procesos en forma natural, por lo cual se presume que la fuente de contaminación de aguas y sedimentos en la región tenga origen antrópico. A nivel de la Zona 3 (Subcuenca del río Carrizal), donde se encontraron niveles más altos de As en agua, es conocido que para las localidades de La Esperanza, Quiroga, Barranco Colorado, Sarampión, Mata Palo y los Almendros existe contaminación del suelo y presión sobre los recursos naturales por actividades agropecuarias; mientras que, para San Bartolo, La Karina y El Limón, la contaminación del agua es ocasionada por establecimientos humanos y, en el caso particular de la localidad El Limón se

agregan actividades agropecuarias ejercidas por una empresa bananera. Por lo que es posible que dentro de esas localidades se empleen agroquímicos en el manejo de las actividades agropecuarias y sean ellos los que generen parte o el total de los niveles de contaminación constatada por As en la subcuenca de Carrizal.

La comparación de las variaciones en las concentraciones de arsénico en las estaciones de muestreo en función de los meses, realizada a través de la prueba de t pareada, (tabla 3) no mostró diferencias significativas para las concentraciones de As en muestras de agua superficial; no obstante, sí se encontraron diferencias significativas para los niveles de As en sedimentos, obteniéndose mayores concentraciones durante el muestreo de octubre que corresponde a la época de caudal de estiaje del río Carrizal.

Tabla 3. Variaciones estacionales de las concentraciones de arsénico en aguas y sedimentos en diferentes estaciones de muestreo en la cuenca del río Carrizal.

Variable	Agosto	Octubre	Diferencia promedio	Desviación estándar	t	Probabilidad
As en agua	13,41	13,49	- 0,08 ns	14,10	- 0,03	0,980
As en sedimentos	14,66	16,73	- 2,07 **	2,77	- 3,34	0,003

(**) Significativo a 1 % de probabilidad por la prueba de t pareada.

En relación a los valores de los límites de los concentraciones de arsénico para las normas canadiense, europea y ecuatoriana (tabla 4), se observa que los valores de arsénico en aguas para las zonas y meses muestreados de la cuenca del río Carrizal superan los límites establecidos en las tres normas consideradas; sin embargo, para los sedimentos en las dos meses de muestreo únicamente a nivel de la subcuenca del río Carrizal es donde los valores de arsénico superan los límites establecidos de acuerdo a la norma canadiense. No existe referencia de límite de concentraciones de arsénico en sedimentos ni para la norma europea ni para la ecuatoriana.

Tabla 4. Comparación de las concentraciones de arsénico en aguas y sedimentos de la cuenca del río Carrizal en relación a referencias internacionales.

Zona de muestreo	Concentraciones de arsénico			
	Aguas (mg/L)		Sedimentos (mg/kg)	
	Agosto	Octubre	Agosto	Octubre
Microcuenca	12,917	2,669	0,001	0,001
Embalse	9,330	6,639	0,001	0,001
Subcuenca	16,005	24,514	32,584	37,186
Norma ambiental de referencia				
Canadiense ¹	0,005		5,900	
Europea ²	0,010			
Ecuatoriana ³	0,100			

Canadiense¹ = Canadian Council of Ministers of the Environment. Europea²: Criterios de calidad de aguas continental de la directiva 75/440/EEC de la Unión Europea; Ecuatoriana³= Ministerio del Ambiente, Edición Especial, Año III, N° 387, noviembre 2015.

CONCLUSIONES

La determinación de las concentraciones de As en zonas agropecuarias, hace imprescindible la georreferenciación para el conocimiento en futuras decisiones ambientales y evitar la biomagnificación de este metal. En este sentido, se concluye que las concentraciones de As en sedimentos de la subcuenca del río Carrizal fueron estadísticamente superiores a los niveles de la microcuenca y en el embalse; mientras que las mayores concentraciones en el agua superficial se presentaron en la subcuenca en el mes de octubre. Las concentraciones de As en los sedimentos superaron los límites nacionales e internacionales establecidos para el consumo humano y para la preservación de la vida acuática, obteniéndose los valores más altos durante la época de caudal de estiaje del río Carrizal. No se han reportado fuentes naturales de arsénico en la cuenca del río Carrizal, por lo que se presume que su presencia es de origen antrópico, lo cual amerita estudios adicionales para su confirmación.

AGRADECIMIENTO

Un cordial agradecimiento a Carlos Banchón (Universidad Agraria del Ecuador) por su asesoría en la determinación del Coeficiente de Distribución del As en agua superficial y sedimento. Un agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Carrera de Ingeniería Ambiental, Calceta, Manabí, Ecuador por permitir el desarrollo de la investigación “Evaluación de los niveles de contaminación por metales pesados en la Microcuenca del Río Carrizal” del Grupo de Investigación “Gestión Integrada de Recursos Naturales y Biodiversidad para el Desarrollo Sostenible”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rosas H. Estudio de la contaminación por metales pesados en la cuenca del Llobregat [Tesis Doctoral]. Barcelona, España: Universitat Politècnica de Catalunya; 2001.
2. Smedley S, Kinniburgh D. A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Appl Geochem*. 2002; 17: 517–568.
3. Wang S, Mulligan C. Occurrence of arsenic contamination in Canada: Sources, behavior and distribution. *Sci Total Environ*. 2006; 366: 701–721.
4. Zambrano CR, González TL, Aranguré ZF, Espinosa RM, Paredes LJ. ¿Arsénico en Nayarit?. *Revista Fuente*. 2011; 3 (6): 25-30.
5. Reyes YC, Vergara I, Torres OE, Díaz MJ, González EE. Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad Alimentaria. *Ingeniería Investigación y Desarrollo*. 2016; 16 (2): 66–77.
6. Katzung B. *Farmacología básica*. México: Editorial Manual Moderno; 2001.
7. Mertens TF. Arsénico en el agua de consumo: riesgo y percepción del riesgo en Las Flores, Provincia de Buenos Aires [Tesis de pregrado]. Tandil: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires; 2018.
8. Correa CM, Bolaños OM, Rebolledo ME, Rubi, MD, Salinas RE. Análisis del contenido de metales en aguas, sedimentos y peces en la cuenca del río Santiago, Provincia de Esmeraldas, Ecuador. *Investigación y Saberes*. 2015; 4 (2): 32-42.
9. MAE: Ministerio del Ambiente de Ecuador. Proyecto adaptación al cambio climático a través de una efectiva gobernabilidad del agua en el Ecuador (PACC). Estudio de vulnerabilidad actual a los riesgos climáticos en el sector de los recursos hídricos en las cuencas de los Ríos Paute, Jubones, Catamayo, Chone, Portoviejo y Babahoyo. Quito: MAE; 2009.
10. Murgueitio E, Cumbal L, Abril M, Izquierdo A, Debut A, Tinoco O. Green Synthesis of Iron Nanoparticles: Application on the Removal of Petroleum Oil from Contaminated Water and Soils. *J Nanotechnology*. 2018: Article ID 4184769, 8 pages. doi:10.1155/2018/4184769
11. Prica M, Dalmacija B, Dalmacija M, Agbaba J, Krčmar D, Tricković J, Karlovic E. Changes in metal availability during sediment oxidation and the correlation with immobilization potential. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2010; 73:1370– 1377.
12. Silva F, Azevedo C. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr J Agric Res*. 2016; 11(39): 3733-3740.
13. Di Rienzo J, Casanoves M, Balzarini L, González M, Robledo C. *InfoStat versión 2017*. Grupo InfoStat, FCA. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba; 2017.
14. Otero X, Tierra W, Atiaga O, Guanoluisa D, Nunes L, Ferreira T, Ruales J. Arsenic in rice agrosystems (water, soil and rice plants) in Guayas and Los Rios provinces, Ecuador. *Sci Total Environ*. 2016; 573: 778-787.
15. Su C, Zhu Y, Abbas Z, Huq M. Sources and controls for elevated arsenic concentrations in groundwater of Datong Basin, northern China. *Environ Earth Sci*. 2016; 75:1–13.
16. Cumbal L, Vallejo P, Rodríguez B, López D. Arsenic in geothermal sources at the north-central Andean region of Ecuador: concentrations and mechanisms of mobility. *Environ Earth Sci*. 2010; 61:299-310.

17. Coral K, Carrillo D, Oviedo J. Arsénico en aguas, suelos y sedimentos de la Reserva Biológica de Limoncocha – Ecuador con fines de conservación. *INNOVA Res J.* 2019; 4:158-169.
18. Rahman M, Siddiqi U, Kure S, Mano A, Udo K, Ishibashi Y. Mobilization of High Arsenic in the Shallow Groundwater of Kalaroa, South-Western Bangladesh. *Expos Health.* 2016; 8(2): 159–175.
19. Reza AS. Occurrence of arsenic in core sediments and groundwater in the Chapai-Nawabganj District, northwestern Bangladesh. *Water Res.* 2010; 44: 2021–2037.
20. Xie X, Wang Y, Ellis A, Liu C, Duan M, Li J. Impact of sedimentary provenance and weathering on arsenic distribution in aquifers of the Datong basin, China: constraints from elemental geochemistry. *J Hydrol.* 2014; 519: 3541–3549.
21. Yu Q, Wang Y, Xie X, Ma R, Wu Y, Li J. Evaluation of groundwater flow model for arsenic mobilization in the Datong Basin *Procedia. Earth Planetary Sci.* 2013; 7: 924–927.
22. Berg M, Tran H, Nguyen C, Pham H, Schertenleib R, Giger W. Arsenic contamination of groundwater and drinking water in Vietnam: A human health threat. *Environ Sci Technol.* 2001; 35: 2621–2626.
23. Shahid M, Niazi N, Dumat C, Naidu R, Khalid S, Rahman M, Bibi I. A meta-analysis of the distribution, sources and health risks of arsenic-contaminated groundwater in Pakistan. *Environ Pollut.* 2018; 242: 307-319.
24. Ravenscroft P, Brammer H, Richards K. *Arsenic pollution: a global synthesis.* Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2009.

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ALGINATO DE SODIO DE LA MACROALGA *Macrocystis pyrifera*

Yerald Ore B., E. Renzo Pichilingue L., Ana C. Valderrama Negrón^a

RESUMEN

En el presente trabajo se propuso un proceso de extracción de alginato de sodio, el cual fue obtenido a partir de la macroalga parda *Macrocystis pyrifera* recolectada en La Punta-Callao. El proceso de extracción presentó un rendimiento del 12 % y el alginato obtenido fue caracterizado mediante las técnicas de IR-TF y RMN ¹³C en estado sólido, el cual fue comparado con un alginato comercial. Se ha llevado a cabo la evaluación de la presencia de bloques manurónicos y gularónicos IR-TF, mediante el uso de la 2da derivada obteniendo señales características a 894 cm⁻¹ para C₁-H α-L-gularónico del alginato extraído de la macroalga *Macrocystis pyrifera* (AlgM) y a 885 cm⁻¹ para la región anomérica C₁-H del β-D-manurónico para el alginato comercial de Sigma Aldrich (AlgC). Asimismo, se asignaron señales características para el espectro del alga a 902 cm⁻¹ y a 812 cm⁻¹ correspondiente a vibraciones de los bloques α-L-gularónico. Mediante ¹³C RMN en estado sólido se obtuvo un pico característico a 102,4 ppm para AlgM asociado al carbono anomérico C₁-H α-L-gularónico, mientras que en AlgC se visualizaron dos picos a 101,8 ppm y a 99,8 ppm asignados a C₁-H α-L-gularónico y C₁-H β-D-manurónico, respectivamente, indicando así la presencia tanto de bloques G y bloques M en el alginato comercial.

Palabras clave: alginato, extracción, *Macrocystis pyrifera*, ¹³C RMN en estado sólido.

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF SODIUM ALGINATE FROM THE MACROALGAE *Macrocystis pyrifera*

ABSTRACT

In the present work, it was proposal a process for the extraction of sodium alginate, which was obtained from the brown macroalgae *Macrocystis pyrifera* collected in La Punta-Callao. The extraction process presented a yield of 12 % and the alginate obtained was characterized by FT-IR and ¹³C NMR techniques in solid state, which was compared with a commercial alginate. The evaluation of the presence of mannuronic and guluronic blocks has been carried out through the use of the 2nd derivative, obtaining characteristic signals at 894 cm⁻¹ for C₁-H

^a LIBIPMET, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru-Rímac, Lima, Perú, anitacvn29@yahoo.com.mx

α -L-guluronic in AlgM and at 885 cm⁻¹ for C₁-H anomeric region of the β -D-mannuronic in AlgC. Moreover, characteristic signals were assigned for the algae spectrum at 902 cm⁻¹ and at 812 cm⁻¹ corresponding to vibrations of the α -L-guluronic blocks. By ¹³C NMR in solid state, a characteristic peak was obtained at 102.4 ppm for AlgM associated with the anomeric carbon C₁-H α -L-guluronic, while in AlgC two peaks were visualized at 101.8 ppm and 99.8 ppm assigned to the C₁-H α -L-guluronic and C₁-H β -D-mannuronic respectively thus indicating the presence of both G blocks and M blocks in commercial alginate.

Key words: Alginate, Extraction, *Macrocystis pyrifera*, ¹³C NMR in solid state.

INTRODUCCIÓN

Actualmente las algas marinas constituyen un sector importante de la economía mundial, esto se debe a las múltiples aplicaciones que tienen, entre ellas su uso en la industria alimentaria y biotecnológica. Estas, son fuente principal de ficocoloides, siendo los más representativos el agar-agar, fucanos, carragenano y alginato¹.

Las algas pardas se caracterizan por encontrarse en mares templados o subpolares, predominando estas en la zona intermareal, caracterizadas por el tamaño de sus tallos y conformando así extensos bosques marinos, en donde la macroalga *Macrocystis pyrifera* es una de las especies más abundante del litoral peruano y a nivel mundial².

Asimismo, esta especie es uno de los insumos de mayor demanda en países tales como EE.UU., Japón, China, Francia y Noruega para la producción de alginato de sodio³.

El alginato es un polisacárido el cual es obtenido a partir de las macroalgas pardas y está principalmente compuesto por los ácidos β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G) figura 1, los cuales se encuentran distribuidos de manera aleatoria en la estructura de la cadena polimérica. Además, el alginato puede presentar secuencias de monómeros de los residuos M y G, así como su alternancia de los mismos obteniendo de esta manera bloques M y bloques G (homopoliméricos), y bloques MG (heteropolimérico)⁴.

La relación del porcentaje de la distribución de los bloques M y G depende de la especie de la cual se obtiene el alginato. Asimismo, parámetros como la localización geográfica, hábitat, y especie determinan la distribución de estos grupos teniendo efecto en las propiedades fisicoquímicas de acuerdo a la relación M/G del alginato obtenido⁵.

Por otro lado, las etapas para llevar a cabo la extracción del alginato influyen en el tipo de alginato obtenido, teniendo un efecto en el tamaño molecular, variación en el contenido de los ácidos urónicos, contenido de iones metálicos, y la presencia de polifenoles⁶.

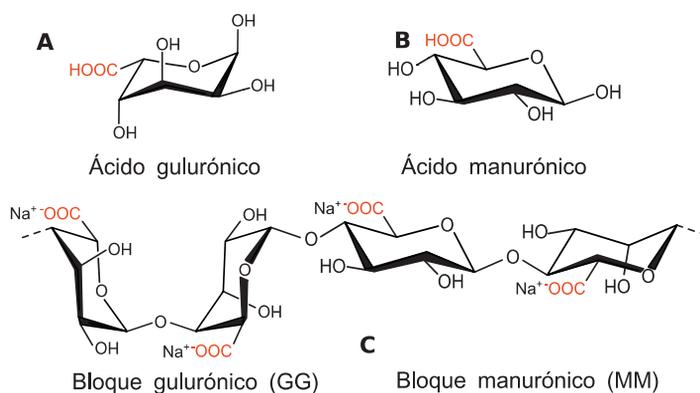


Figura 1. (A) Ácido gulurónico. (B) Ácido manurónico. (C) Composición del alginato con bloques GG y Bloques MM⁴.

En consecuencia, estas propiedades podrían definir el uso versátil de este polisacárido en distintos campos, así como sus derivados, presentando actividad biológica, biodegradabilidad y biocompatibilidad en sistemas vivos, en su actividad como agente anti-incrustante, intercambiador iónico (para un M/G < 1), entre otros, fines de aplicación industrial^{4,7}.

Es de este modo que, a lo largo de los últimos años, se han propuesto distintas metodologías para la extracción y purificación del alginato, mediante la obtención de ácido alginico⁸, a partir de la formación de geles mediante CaCl₂⁹, implementación de un pre-tratamiento⁵, entre otros, las cuales en su mayoría se enfocan en optimizar el rendimiento de la extracción.

En el presente trabajo, se ha propuesto un proceso de extracción del alginato a partir del método alcalino y la formación de geles haciendo uso de CaCl₂, teniendo como principal objetivo la caracterización del biopolímero mediante técnicas de IR-TF y su segunda derivada, y mediante ¹³C RMN en estado sólido para evaluar el contenido de los bloques M y G presentes en el alginato, lo cual nos permitirá estimar si la relación M/G es menor o mayor a 1.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES

El alginato de sodio (AlgC) fue adquirido de Sigma Aldrich Chemistry (St. Louis, MO, USA), Los solventes utilizados fueron de grado analítico adquiridos de MERCK (Darmstadt, Germany); La *Macrocystis pyrifera* fue colectada entre 5-10 m de profundidad a 16°C en la La Punta-Callao. Una vez llevado a cabo esto, se lavaron y almacenaron a -20°C. Las hojas que han sido usadas como materia prima para la producción de alginato fueron cortadas en trozos pequeños y secados en una estufa a 70°C por 3 h. Finalmente, esta fue molida a un tamaño menor a 1mm.

EXTRACCIÓN DEL ALGINATO

Se tomaron 50 g de alga pulverizada y se procedió a colocarla en una solución de n-hexano en relación (1:3) por 2 horas. Luego los trozos desengrasados (por el tratamiento con n-hexano) se colocaron en una mezcla etanol/formaldehído (4:1) dejando reposar por 72 h. El producto obtenido fue tratado con carbonato de sodio al 3 % a 90°C por 4h (proceso de extracción alcalino)¹⁰. Finalmente se dializó y liofilizó la fase líquida obtenida del proceso de extracción.

Asimismo, la purificación fue llevada a cabo mediante el uso de CaCl_2 (formación de geles). A partir del producto obtenido se realizó un intercambio de la forma sal/ácida del alginato, variando el pH alcalino/ácido. Finalmente, el producto obtenido fue dializado y liofilizado, obteniendo un sólido blanco, $\text{AlgM}^{6,8,11}$.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (IR-TF)

El espectro infrarrojo fue obtenido usando un FT-IR IRPrestigy-21 mediante el método de reflectancia total atenuada (ATR). Los espectros fueron medidos (64 scans/muestra) en el rango de 4000-700 cm^{-1} , con una resolución de 4,0 cm^{-1} . La derivatización incluyó el algoritmo de Savitzky-Golay con 23 puntos de suavizado y todos los espectros fueron analizados con el software OriginLab 9.0.

^{13}C RMN EN ESTADO SÓLIDO

El análisis de RMN ^{13}C en estado sólido fue llevado a cabo usando un equipo Bruker Advance III-400, operando a 9,4 T de campo magnético, $\nu(1\text{H}) = 400\text{ MHz}$. La ^{13}C frecuencia de resonancia fue de 100.57 MHz con un pulso de secuencia (polarización cruzada con un ángulo mágico de spin, CP-MAS) y con una supresión total de banda (CP-MAS-TOSS). El alto poder de desacoplamiento del campo fue de 83.3KHz [P90 (1H) = 3 μs] y se usó “adamantano” como patrón de referencia externo para ajustar el desplazamiento del ^{13}C .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EXTRACCIÓN DEL ALGINATO

El proceso de extracción fue propuesto a partir de los trabajos de Matsuhiro *et al.*¹² y Hernández-Carmona *et al.*¹⁰ el cual consistió en 3 etapas; i. Pre-tratamiento, ii. Extracción alcalina y iii. Purificación.

El primer paso fue someter el alga pulverizada a un pre-tratamiento, que consistió en un desengrasado a partir del uso de n-hexano, seguido de una eliminación de metabolitos (taninos, polifenoles, etc.) mediante un tratamiento con la mezcla etanol/formaldehído en relación de 4/1. A partir de la muestra obtenida, se procedió a llevar a cabo la extracción en medio alcalino (carbonato de sodio al 3 %) el cual permitió extraer los polisacáridos presentes en la pared celular del alga, manteniendo una temperatura de 90°C por 4 horas, obteniéndose finalmente así un extracto impuro (figura 2) del cual se aislaron 2 fases mediante centrifugación por 30 min y finalmente el líquido obtenido, fue liofilizado para su pronta purificación.

De la purificación se obtuvo el ácido alginico, después de remover las impurezas presentes, ya que no solamente podríamos a ver aislado alginato de sodio el cual es el biopolímero en interés sino también, hemicelulosa, fucanos, carbohidratos, entre otros¹³. Es de este modo que se implementó dentro del proceso de purificación, la formación de geles con Ca^{+2} (para la selectividad del alginato) y procesos de diálisis y centrifugación para la mayor purificación del alginato¹⁴. Obteniendo, de este modo, un material blanquecino, como podemos observar en la figura 3.

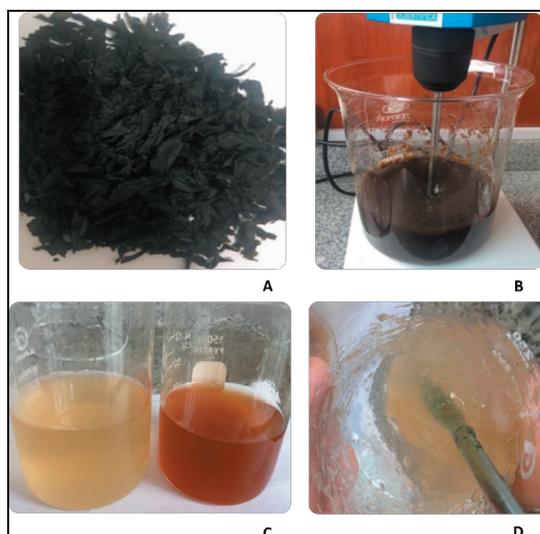


Figura 2. Extracción de alginato. (A) Materia prima, alga. (b) Tratamiento alcalino. (C) Comparación antes y después del alginato extraído y su purificación. (D) Intercambio de kps, en el proceso de purificación.



Figura 3. Alginato extraído de la macroalga *Macrocystis pyrifera*.

El rendimiento obtenido del proceso de extracción propuesto del alga fue del 12 % para la *Macrocystis pyrifera*. El protocolo propuesto permitió obtener un alginato de coloración blanquecina, lo que indicaría que en el proceso se pudo eliminar gran contenido de polifenoles, presentes en el alga parda de partida. A pesar de esto, el rendimiento no fue tan alto a comparación de las obtenidas para otras algas ya reportadas^{15,16}. Esto, posiblemente es debido, al ambiente natural, estación de la cosecha³, entre otros factores que involucran al entorno del crecimiento del alga. Asimismo, otro factor que influiría en el rendimiento, serían los pasos tomados en cada etapa del proceso de extracción, ya que cada tratamiento es determinante y no solo involucra la extracción del alginato, sino también la influencia en la degradación del mismo, debido al tratamiento de hidrólisis (ácida o básica)¹⁷ que ocurre a lo largo de la cadena del biopolímero, disminuyendo así su masa molecular modificando las propiedades que podría presentar, influenciadas estas por la secuencia de los bloques M y G y su proporción M/G presente en la cadena polimérica.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (IR-TF)

En la figura 4 presentamos los espectros del alga de partida (*Macrocystis pyrifera*), el alginato extraído (AlgM) y el alginato comercial de Sigma Aldrich (AlgC), de este modo podemos asignar los grupos funcionales acorde a las vibraciones que presenta la figura 4. En este caso las señales características del alginato más representativas son:

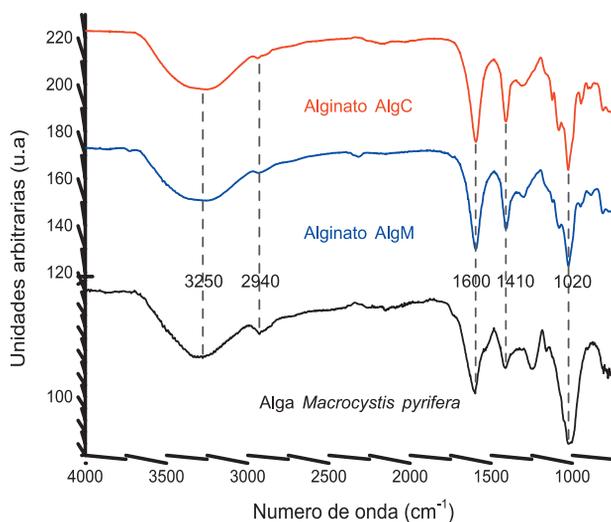


Figura 2. Espectro IR-TF del Alga *Macrocystis pyrifera*, Alginato AlgM y Alginato AlgC.

La señal alrededor de 3250 cm^{-1} y 2940 cm^{-1} correspondientes a la vibración de estiramiento del grupo funcional O-H y C-H, respectivamente, ambos presentes a lo largo de la cadena del alginato. Además, alrededor de 1600 cm^{-1} y 1410 cm^{-1} se observa la vibración antisimétrica y simétrica respectivamente, del grupo carboxilato. Entre 1300 a 1000 cm^{-1} podemos asociar las señales características de las vibraciones de estiramiento de C-C-H, O-C-H, C-O-C, entre otros, asociados al entorno de la piranosa, siendo la más representativa la banda 1020 cm^{-1} asociada a la vibración de estiramiento C-O-C de la piranosa⁷.

Por otro lado, en el caso del espectro de la macroalga *Macrocystis pyrifera*, presentamos a 1540 cm^{-1} una banda atribuida a la vibración de estiramiento de grupo amida (N-H), esto debido a la presencia de proteínas. Asimismo, a 1750 cm^{-1} asignamos la señal del grupo C=O el cual caracteriza a la presencia de lípidos. Finalmente, a 1250 cm^{-1} encontramos una banda que representa a la vibración de estiramiento del grupo S=O, característico a la presencia de otros polisacáridos presentes en el alga¹⁸.

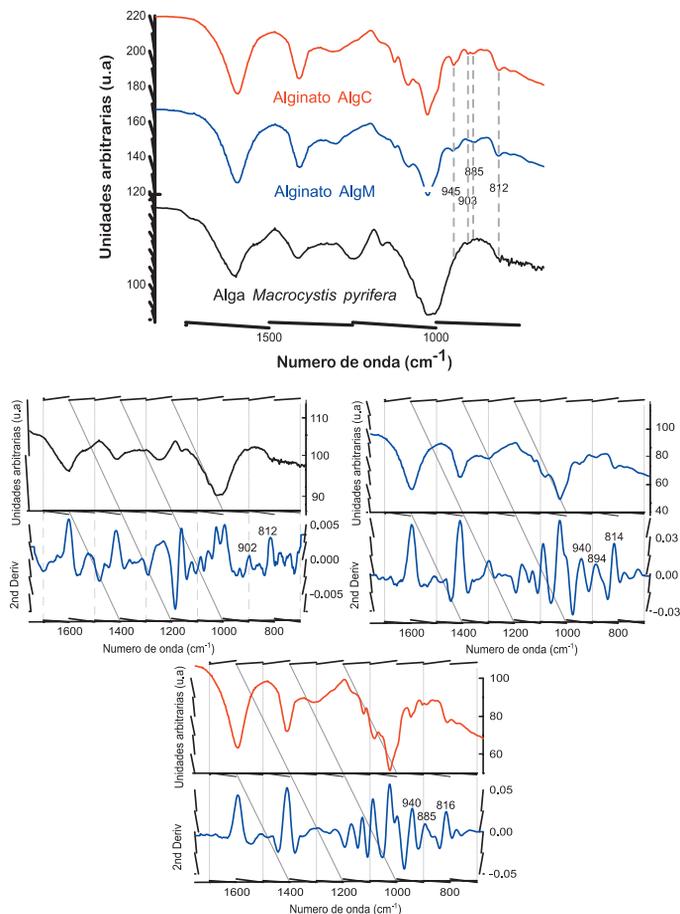


Figura 5. Espectro FT-IR y su segunda derivada en la región de la huella dactilar.

En el entorno de la huella dactilar podríamos atribuir bandas asociadas a los bloques homopoliméricos tanto de GG y MM. Evaluando las señales entre 1200 a 750 cm^{-1} (figura 5) observamos bandas características a 945 cm^{-1} , la cual es asignada a las vibraciones C-O, con contribución de C-C-O debido a la deformación vibracional de los residuos de los ácidos urónicos presentes en ambos alginatos. Las bandas a 903 y 885 cm^{-1} son asignadas a las vibraciones de deformación de $\text{C}_1\text{-H}$ $\alpha\text{-L-gulurónico}$ y $\text{C}_1\text{-H}$ del $\beta\text{-D-manurónico}$. Asimismo, a 812 cm^{-1} ambos alginatos presentan esta banda característica de deformación de la piranosa de los bloques $\alpha\text{-L-gulurónico}$ ^{7,14}.

Por otro lado, para evaluar significativamente las diferencias que existen en estos espectros se procedió a realizar la 2da derivada (figura 5) para visualizar aquellas señales que no son fácilmente observables en el espectro común, tales como las interacciones para cada bloque MM y GG. Es así que tenemos para AlgM la banda a 894 cm^{-1} la cual es característica a la vibración de la región anomérica $\text{C}_1\text{-H}$ $\alpha\text{-L-gulurónico}$ a diferencia de AlgC el cual presenta una banda a 885 cm^{-1} característico a la vibración de la región anomérica $\text{C}_1\text{-H}$ del $\beta\text{-D-manurónico}$ ^{7,11}.

Ambos alginatos presentaron señales a 940 cm^{-1} , lo cual fue asignado a la vibración de estiramiento C-O. Finalmente, en el caso del espectro de la macroalga, podemos observar las señales a 902 cm^{-1} y a 812 cm^{-1} característicos a la deformación de la piranosa de los bloques $\alpha\text{-L-gulurónico}$ pudiendo interpretar la presencia de los bloques GG antes de llevar a cabo el proceso de extracción del alginato.

Por lo tanto, de los resultados obtenidos, tenemos que el AlgM y AlgC presentan diferencias respecto a la relación del contenido de bloques M y G ya que se han observado diferencias en las bandas que corresponden $\text{C}_1\text{-H}$ $\alpha\text{-L-gulurónico}$ y $\text{C}_1\text{-H}$ del $\beta\text{-D-manurónico}$ presentes en la cadena polimérica, los cuales serán mejor diferenciados mediante el ensayo de Resonancia Magnética Nuclear.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EN ESTADO SÓLIDO

La figura 6 muestra el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido del AlgM y AlgC

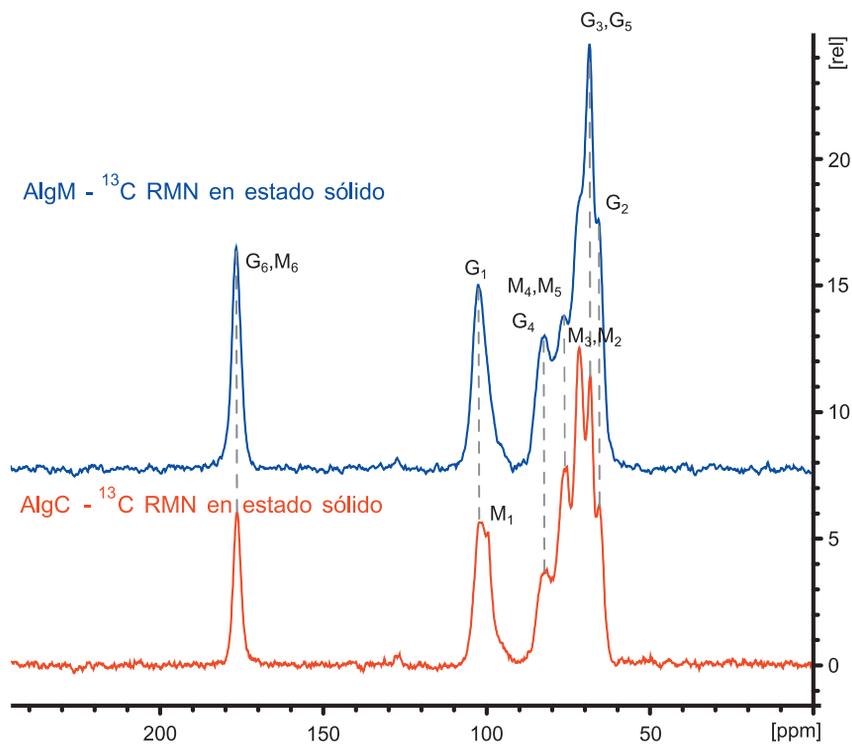


Figura 6. Análisis RMN ^{13}C en estado sólido de AlgM y AlgC.

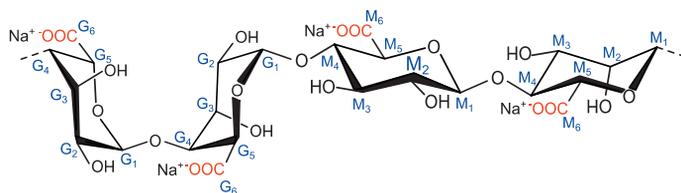


Figura 7. Estructura del alginato con cada carbono enumerado.

En la tabla 1 se muestran los desplazamientos químicos obtenido a partir del RMN ^{13}C en estado sólido de la figura 6.

- Los grupos carboxilatos (160 – 180 ppm)
- Puente glicosídico (90 – 110 ppm)
- Entorno de la piranosa (50 – 80 ppm)

Tabla 1. Asignación de los espectros RMN ¹³C en estado sólido de la figura 6 tomando en consideración la estructura del alginato mostrado en la figura 7.

Ambiente Químico	Carbonilo	Anomérico	Piranosas								
Carbones de los grupos manurónicos (M) y gulurónicos (G)	G ₆ M ₆	G ₁ M ₁	G ₄ M ₄ M ₅ M ₃ M ₂ G ₃ G ₅ G ₂								
D. Químico AlgC (ppm)	176,4	101,8 99,4	82,1 75,7 71,7 68,3 65,5								
D. Químico AlgM (ppm)	176,1	102,4 ---	81,6 75,6 71,6 68,2 65,4								
Desplazamiento Químico (ppm) ¹⁹	176,3	102,2 99,5	82,8 76,4 71,6 68,4 65,5								

Evaluando las diferencias entre AlgM y AlgC, obtenido de la tabla 1 y de la figura 7, tenemos que la presencia de los carbonos G son más representativos en AlgM que en AlgC. Como se ha mencionado anteriormente, el entorno entre 110 – 90 ppm evalúa los carbonos presentes en el puente glicosídico el cual determina la interacción y la formación de los bloques presentes. A 102,4 ppm tenemos al carbono anomérico C₁-H α-L-gulurónico que se observa en el AlgM desplazándose esta señal a un campo más bajo que el que presenta AlgC a 101,8 ppm. En el espectro de este último también se observa la señal del carbono anomérico C1-H del β-D-manurónico a 99,8 ppm indicando así la presencia característica de los bloques M, lo que no se observa en el AlgM.

Asimismo, evaluando el entorno de la piranosas presentamos señales de los carbonos G₃-G₅ los cuales son más intensos que las señales de M₃ y M₂ para el AlgM, soportando así la propuesta que este alginato presenta un mayor % de grupos G. A diferencia de esto tenemos que en AlgC, se presenta señales más intensas alrededor de M₃ y M₂ y el pico que caracteriza a G₃-G₅ la señal es casi indistinguible.

Por ende, a partir de estos análisis podemos interpretar que la relación M/G para el AlgM es <1 y para el AlgC >1. De la misma manera, nos permite proponer que para el AlgM existe un mayor porcentaje de bloques G a diferencia del AlgC. A partir de estos resultados, con el AlgM se podría obtener materiales que se beneficien a partir de la propiedad de reticulación iónica a diferencia de AlgC, debido a la mayor presencia de bloques GG en la estructura del alginato de AlgM. A pesar de ello, la presencia de bloques M a diferencia de los bloques G, son menos reactivos y por tanto son más estables frente a procesos de modificación y degradación^{7,20}.

CONCLUSIONES

Se logró extraer alginato sodio, el cual presentó un rendimiento del 12 %. Para el alginato obtenido de la macroalga (AlgM) se logró demostrar la presencia de carbonos y grupos que asocian a la región anomérica del C₁-H α -L-gulurónico. Asimismo, el espectro del alga, mostró bandas a 902 cm⁻¹ y a 812 cm⁻¹ característicos de los bloques G lo que indicaría que esta macroalga es rica en grupos gulurónicos a diferencia del alginato comercial (AlgC). Finalmente, mediante los resultados obtenidos se interpretaría que la relación M/G para AlgM sería <1 y para AlgC >1.

Es así que ambas técnicas (IR-TF y RMN en estado sólido) nos permiten diferenciar la presencia de bloques M y G, así como poder interpretar antes de llevar a cabo la extracción de alginato, la presencia de bloques gulurónicos en la macroalga.

AGRADECIMIENTO

Al Lic. Ronny G. Huamaní Palomino, por su contribución en las discusiones del IR-TF y ¹³C RMN en estado sólido. Asimismo, al Vicerrectorado de Investigación y a la Oficina de Gestión de la Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería por el financiamiento del proyecto FC-F-13-2018.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Øverland M, Mydland LT, Skrede A. Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals. *J Sci Food Agric*. 2019; 99(1):13-24.
2. Baweja P, Kumar S, Sahoo D, Levine I. *Biology of Seaweeds*. In: Fleurence J, Levine I. *Seaweed in Health and Disease Prevention*. London: Academic Press; 2016. p 41-106.
3. Peteiro C. Alginate Production from Marine Macroalgae, with Emphasis on Kelp Farming. In: Rehm B, Moradali M. (eds) *Alginates and Their Biomedical Applications*. Singapore: Springer; 2018. p 27-66.
4. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37(1):106-126.
5. Arvizu-Higuera DL. Parameters affecting the conversion of alginic acid to sodium alginate. *Ciencias Mar*. 2002; 28(1):27-36.
6. Hernández-Carmona G, Freile-Pelegrín Y, Hernández-Garibay E. Conventional and alternative technologies for the extraction of algal polysaccharides. In: Dominguez H. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Cambridge, United Kingdom: Woodhead Publishing; 2013. p 475-516.
7. Huamaní-Palomino RG, Jacinto CR, Alarcón H, Mejía IM, López RC, Silva D de O, *et al*. Chemical modification of alginate with cysteine and its application for the removal of Pb(II) from aqueous solutions. *Int J Biol Macromol*. 2019;129: 1056-1068.

8. Chandía NP, Matsuhiro B, Mejías E, Moenne A. Alginic acids in *Lessonia vadosa*: Partial hydrolysis and elicitor properties of the polymannuronic acid fraction. *J Appl Phycol*. 2004;16(2):127–133.
9. Reyes Tisnado R, Hernández Carmona G, Rodríguez Montesinos E, Arvizu Higuera D, López Gutiérrez F. Food grade alginates extracted from the giant kelp *Macrocystis pyrifera* at pilot-plant scale. *Rev Investig Mar*. 2005;26(3):185–192.
10. Hernández-Carmona G, McHugh DJ, Arvizu-Higuera DL, Rodríguez-Montesinos YE. Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera* 3. Precipitation, bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid. *J Appl Phycol*. 2002; 14(6):445-451
11. Chandía NP, Matsuhiro B, Vásquez AE. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: Characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydr Polym*. 2001;46(1):81–87.
12. Martínez-Gómez F, Guerrero J, Matsuhiro B, Pavez J. *In vitro* release of metformin hydrochloride from sodium alginate/polyvinyl alcohol hydrogels. *Carbohydr Polym*. 2017;155:182–191.
13. García-Vaquero M, Rajauria G, O'Doherty J V., Sweeney T. Polysaccharides from macroalgae: Recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification. *Food Res Int*. 2017; 99(Part 3): 1011-1020.
14. Leal D, Matsuhiro B, Rossi M, Caruso F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydr Res*. 2008;343(2):308–316.
15. Hagen Rødde RS, Vårum KM, Larsen BA, Myklestad SM. Seasonal and geographical variation in the chemical composition of the red alga *Palmaria palmata* (L.) Kuntze. *Bot Mar*. 2004;47(2):125–133.
16. Rhein-Knudsen N, Ale MT, Ajalloueiian F, Meyer AS. Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: *Sargassum* spp. and *Padina* spp. *Food Hydrocoll*. 2017; 71: 236-244.
17. Draget KI, Taylor C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocoll*. 2011;25(2):251–256.
18. Kleinübing SJ, Gaia F, Bertagnolli C, Da Silva MGC. Extraction of alginate biopolymer present in marine alga *sargassum filipendula* and bioadsorption of metallic ions. *Mater Res*. 2013; 16(2):481–488.
19. Salomonsen T, Jensen HM, Larsen FH, Steuernagel S, Engelsen SB. Direct quantification of M/G ratio from ¹³C CP-MAS NMR spectra of alginate powders by multivariate curve resolution. *Carbohydr Res*. 2009;344(15):2014–2022.
20. Gómez CG, Rinaudo M, Villar MA. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. *Carbohydr Polym*. 2007; 67(3): 296–304.

GESTIÓN AMBIENTAL EN LA ENSEÑANZA DE LA QUÍMICA ANALÍTICA

Elizabeth Norma Espinosa Descalzo*

RESUMEN

El objetivo del presente artículo es generar reflexión respecto al compromiso docente de actualizarse en la problemática ambiental e introducir la asignatura Educación Ambiental en el desarrollo de los principales contenidos teóricos y prácticos de los cursos de la Escuela Profesional de Química en la formación de futuros profesionales quienes, además de dominar la ciencia, dentro de su campo y rango de acción, profundicen con el suficiente rigor, el compromiso con el ambiente, además de minimizar las emisiones nocivas que sus actividades generan, para contribuir al desarrollo sostenible. Una forma de incluir los principios de la Educación Ambiental, es mediante la realización de una gestión participativa en las prácticas de laboratorio, en base al principio de reducción en la fuente que, además de ayudar en la preservación ambiental, puede generar beneficios económicos como la disminución del consumo de reactivos del orden del 33,33 al 80 %. Asimismo, en el orden formativo, propicia el ejercicio del pensamiento crítico del estudiante y, motiva su participación activa como ciudadano en cuanto a los problemas ambientales, que no sólo son exclusivos al campo de la tecnología, además, tienen el encargo social de formar valores, actitudes y conductas que influyan en las personas y grupos de su entorno.

Palabras clave: impacto ambiental, desarrollo sostenible, educación ambiental, gestión ambiental, emisiones nocivas.

* Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida Universitaria s/n, Lima 1, Perú
eespinosad@unmsm.edu.pe
dirección Jirón Miraflores 252, Lima, 15076

ENVIRONMENTAL MANAGEMENT IN THE TEACHING OF ANALYTICAL CHEMISTRY

ABSTRACT

This article was written with the objective of stimulating reflection on the commitment of teachers to be updated on environmental issues and introduce the Environmental Education subject in the development of the main theoretical and practical contents of the Professional School Chemistry courses on the training of future professionals. These individuals besides of mastering science in their field and range of action, should deepen in the commitment to the environment with sufficient rigor, besides minimizing the harmful emissions their activities would generate in order to contribute to sustainable development. One way to include the principles of Environmental Education is through participatory management in laboratory practices based on the principle of source reduction which, in addition to helping environmental preservation, can generate economic benefits such as reduction in reagent consumption of order 33.33 to 80 %. Furthermore, it fosters the exercise of the critical thinking of the student and motivates their active participation as a citizen in terms of environmental problems, which are not only exclusive to the field of technology, but it also has the social responsibility of forming values, good habits and behaviors that influence people around them.

Key words: environmental impact, sustainable development, environmental education, environmental management, harmful emissions.

INTRODUCCIÓN

El uso excesivo e inadecuado de los recursos, naturales y sintéticos, como el agua y los químicos, causan graves alteraciones en el medio ambiente, que reducen las posibilidades de vida en sus diversas formas, acelerando el cambio climático, contaminando suelos, aire, agua y ejerciendo una excesiva presión sobre las reservas naturales a una escala no sostenible. A pesar de conocerse las graves consecuencias de tales prácticas, ellas están muy extendidas entre la población en general, y resulta alarmante observar el despilfarro de recursos por parte de estudiantes, profesionales, personal administrativo y hasta docentes, que mantienen una actitud indiferente y negligente ante tal comportamiento.

Un mayor consumo de recursos hídricos y su mal uso, conduce a volúmenes excesivos de efluentes, elevando los costos de adecuación para reúso o disposición final, tanto para las empresas municipales, que tratan el efluente del alcantarillado general a través de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR), como para las particulares, que están obligadas por la legislación ambiental peruana a tratar los efluentes generados por sus actividades productivas, antes de su vertimiento en los reservorios de agua receptores¹. Sin embargo,

diversos sectores empresariales se acogen a prórrogas oficiales reiteradas que les permiten seguir con las mismas prácticas que han conducido a los problemas ambientales, como el Decreto Legislativo N.º 1285 (2016), que flexibiliza la función fiscalizadora del Estado, de manera que la Autoridad Nacional del Agua (ANA) ya no requiere de la previa opinión técnica favorable de las autoridades de los Ministerios del Ambiente (MINAM) y de Salud (MINSa) para otorgar autorizaciones de vertimiento de efluentes; esto implica que las empresas no sean sancionadas por tener o no, autorización de vertimientos, evaluación de impacto ambiental y autorización de uso de agua residual, y contarán con un plazo de nueve años para la adecuación de sus vertimientos a los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) y límites máximos permisibles para vertimientos en el alcantarillado general (LMP); por si fuera poco, prohíbe a la ANA efectuar visitas inopinadas a titulares de las autorizaciones de vertimientos, entre otros aspectos².

En el ámbito científico educativo, la Facultad de Química e Ingeniería Química (FQIQ) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), presenta determinadas limitaciones en sus instalaciones para el desarrollo de las actividades docentes y de investigación, de ellas, una baja eficiencia en los sistemas de ventilación-extracción en el laboratorio del curso Química Analítica Cuantitativa clásica, para controlar la contaminación generada por el uso de sustancias volátiles durante las prácticas, que comprenden, el análisis de muestras de minerales, aleaciones y otras en mayor escala, desde su disolución con ácidos fumantes, hasta su cuantificación, mediante procedimientos gravimétricos y volumétricos.

Además, la mayoría de los métodos analíticos incluidos en las guías de prácticas del curso³, fueron desarrollados entre 1940-1960, en laboratorios que contaban entonces con mejores sistemas de control de emisiones, mientras que, en estos momentos, los estudiantes y docentes de la facultad, están expuestos a estas emisiones. En varios de los actuales métodos, se ha observado un uso excesivo de reactivos, lo cual contribuye a incrementar la magnitud de los impactos ambientales mencionados, con consecuencias negativas sobre la salud de docentes y estudiantes, además de emplear un mayor gasto en reactivos. Desde un punto de vista analítico, en el caso de las determinaciones gravimétricas, la solubilidad de los precipitados es incrementada por la mayor concentración de sales presentes, a causa de la influencia de la fuerza iónica o efecto salino, causando resultados falsos negativos, además de incrementarse los fenómenos de contaminación de los precipitados por adsorción, oclusión y otros^{4,5}.

Considerando los aspectos legales, pedagógicos y éticos, desarrollar las experiencias de laboratorio en las condiciones mencionadas, no estaría contribuyendo a formar químicos respetuosos del ambiente, comprometidos y capacitados para asumir la responsabilidad de reducir los impactos de sus actividades profesionales y de contribuir al logro de los objetivos del desarrollo sostenible, lo cual debería ser prioritario ante el cambio climático acelerado y el desequilibrio de los diversos ecosistemas, cuestión que pone en riesgo evidente a la especie humana y a las diversas formas de vida que de las que depende⁶.

Ante esta situación, la tesis que sustenta este artículo, ha determinado estudiar las posibles causas de los patrones no sostenibles de consumo y la falta de compromiso de la ciudadanía

para asumir sus obligaciones ambientales, con el propósito de contribuir a mejorar la situación desde su rol de educadora, interpretando el sentido y compartiendo la frase del estadista francés Jacques Chirac (1932-2019) “*Nuestro hogar está en llamas y nosotros, mirando a otro lado...*”

Como criterio de la autora, avalado por los resultados del trabajo científico desplegado en ese sentido, una posible razón para esta problemática sería la falta de sensibilización y capacitación de los profesionales de las carreras científicas y de las diversas especialidades de ingeniería para realizar una adecuada gestión ambiental de sus procesos mediante actividades concretas que permitan racionalizar el uso de los recursos desde la fuente, incluyendo la modificación de procesos, reducción y/o sustitución de insumos por otros más inocuos, reúso y reciclaje, entre otros⁷.

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

En el caso específico de los estudiantes y egresados de las escuelas profesionales de química e ingeniería química, es prioritaria una capacitación profunda para realizar una gestión ambiental de los procesos, dada la relación con el uso y producción de químicos que provocan la generación de efluentes de diverso grado de toxicidad, volumen y concentración.

Para cumplir con el objetivo mencionado, se han consultado fuentes bibliográficas diversas, como las guías elaboradas por la American Chemical Society (ACS) en sus versiones 1990 y 2002, entre otras, cuya finalidad es promover la gestión adecuada de los desechos en los laboratorios químicos, el desarrollo de alternativas para reducir los volúmenes de desechos antes de la disposición final, frente al problema de saturación de los rellenos de seguridad autorizados, los riesgos de fugas desde los mismos, y los probables accidentes durante el traslado de tóxicos, así como la orientación a los químicos en el conocimiento de la legislación y las especificidades en cuanto a su cumplimiento.

Si bien, estas fuentes^{8,9}, no proponen soluciones particulares, mencionan algunas alternativas potenciales que son usualmente realizadas en los laboratorios para el manejo de los desechos peligrosos, en tanto que también, enfatizan la importancia y jerarquía de aplicar el principio de reducción en la fuente, como punto de partida para reducir la generación de este tipo de desechos, promoviendo además el reúso y reciclaje de recursos, siempre que sea factible. En otras publicaciones sobre gestión ambiental en laboratorios de enseñanza, por lo general, presentan recomendaciones generales¹⁰, más no, un procedimiento sistemático y fundamentado para realizar la reducción de los reactivos en los métodos estudiados, haciéndolo mediante la reducción de un porcentaje de algunos reactivos, o del peso de la muestra, además del reemplazo de reactivos tóxicos por otros menos agresivos con el medio. Para cumplir con el compromiso ético de contribuir a mejorar la capacitación de los estudiantes en aspectos ambientales relacionados con el curso Química Analítica Cuantitativa y de su respectivo laboratorio, se inicia las actividades experimentales con enfoque verde, a partir del año 2017, donde se incluyeron los fundamentos de la educación ambiental en las

actividades del curso, mediante charlas y actividades propias de una gestión ambiental, en base a los principios de la Química Verde¹¹. Para ello se hizo una adecuada revisión teórica con su correspondiente parte experimental, mediante los procedimientos analíticos de la guía de prácticas del curso, considerando la trascendencia de enseñar con el ejemplo.

En las clases de laboratorio se estableció la siguiente secuencia de actividades: introducción sobre los principios de la educación ambiental; explicación de los fundamentos analíticos del método en particular, analizando el tipo de muestra, sus propiedades, solubilidad, las condiciones de seguridad para el manejo de los reactivos, entre otros.

Lo novedoso y a la vez necesario del diseño, es que se incorpora un análisis crítico con enfoque ambiental de cada etapa del método por desarrollar, propiciando la intervención general mediante las opiniones de cada estudiante. Se estima teóricamente el volumen mínimo necesario de ácido para la disolución de la muestra, aplicando la estequiometría y suponiendo que la masa total de la muestra correspondería a la sal anhidra del analito, dado que no se conocen exactamente todos los componentes de la misma.

Dicha suposición permite plantear la ecuación química balanceada de la disolución de la masa de muestra con el ácido específico, para obtener los equivalentes gramo y/o pesos fórmula gramo del analito en dicha muestra, el volumen necesario de ácido según su concentración, controlar el exceso adecuado del ácido, para asegurar una reacción de disolución cuantitativa de la muestra. De la misma forma se realiza el cálculo del reactivo requerido para lograr la precipitación cuantitativa del analito, incluyendo el exceso necesario para el desplazamiento del equilibrio en favor del producto, en función de su solubilidad.

Esta actividad ha sido desarrollada por la autora en el laboratorio del curso Química Analítica Cuantitativa de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM, desde el 2017 al 2020, bajo un enfoque ambiental y formativo, con la participación de los estudiantes de la Escuela Profesional de Química de los grupos a su cargo, como tema central de la preparación de su tesis de maestría en Educación, con mención en Educación Ambiental y aprobada e inscrita como proyecto de tesis en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Educación de la UNMSM el 13 de febrero de 2020, habiéndose revisado los métodos analíticos de las siguientes guías de prácticas del curso de los semestres 2017-1, 2018-1, 2019-1 y 2020-1 :

1. Determinación gravimétrica de sulfato en yeso como sulfato de bario (guías 2018-2019).
2. La determinación de sílice, como parte del análisis gravimétrico de una muestra de caliza (guía de 2020-1)
3. La disolución de la muestra de una aleación ternaria de níquel para la determinación gravimétrica de níquel en aleaciones con dimetilglioxima (guía 2018-1).
4. Determinación gravimétrica de ion ortofosfato en fosfatos con molibdato de amonio (guías 2019-1 y 2020-1)

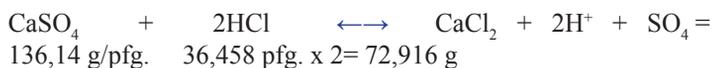


Figura 1. Imagen de la investigadora, presentando tres muestras en bruto de caliza, una de ellas finamente molida.

PARTE EXPERIMENTAL

Antes de realizar la parte experimental, se efectuaron los cálculos de las modificaciones en las cantidades y procedimientos, según los ejemplos de cálculo que son similares para los métodos enumerados en la sección anterior como 1, 2 y 4.

Cálculo del volumen necesario para disolver en promedio 0,15g de la muestra de yeso para la determinación de sulfatos; cuyo componente principal es $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (172,14 g/pfg). En este caso, se asume que el total de la masa de muestra corresponde a sulfato de calcio anhidro, CaSO_4 , (136,14 g/pfg.) para plantear la reacción estequiométrica de disolución de la muestra, que ya incluye un exceso al considerarla una sal anhidra:



Cálculo estequiométrico:

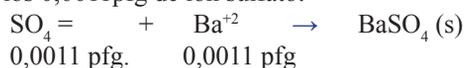
0,15 g/136,14 g/pfg = 0,0011pfg de CaSO_4 reaccionan con 0,0022 pfg. de HCl, luego si 1000 mL de HCl contienen 12 moles de HCl

V mL de HCl contienen 0,0022 moles de HCl $V = 0,1836 \text{ mL} = 0,20 \text{ mL}$

Se decide emplear 1 mL de HCl 12M, el cual incluye un exceso con respecto al mínimo de 0,8 mL, aproximadamente, considerando que la masa de muestra podría variar entre 0,12 y 0,20 g. y contener otros constituyentes de menor pfg. que consuman ácido, además de las posibles pérdidas por evaporación durante la disolución.

Para minimizar las emisiones de cloruro de hidrógeno gaseoso al verter el HCl 12M necesario por muestra, un solo estudiante prepara 200 ml de HCl 6M, del que, cada uno,

extrae 2 mL. /muestra, el cual, podría diluirse a 3 M, dado que se agregan 25 mL de agua destilada como parte del medio para este proceso, reduciéndose proporcionalmente el agua por agregar. La temperatura óptima de disolución de la muestra estuvo alrededor de los 50-60°C, dada la curva de solubilidad del sulfato de calcio dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 25°C del orden de 0,2358 g/100 mL, alcanzando su mayor solubilidad en agua a 58°C y después decae¹³, siendo soluble en ácido clorhídrico diluido. Al disolverse a una temperatura entre 50-60°C se previenen las pérdidas de HCl por volatilización, reduciendo las emisiones al ambiente durante la disolución de la muestra. Igual procedimiento se ha generalizado para el cálculo del ácido necesario por muestra y para cada método, dejando de usar y medir ácidos concentrados y en exceso. En las muestras con contenidos considerables de hierro, aluminio, manganeso u otras sales hidrolizables, se debe emplear un mayor exceso de ácido diluido para prevenir la hidrólisis. Una vez disuelta la muestra, se neutraliza el exceso de ácido con amoníaco (NH_3) gastando entre 0,7 y 0,8 ml de NH_3 15M, aproximadamente; luego se agrega el ácido necesario para ajustar a un pH cercano a 0,3 un volumen de 100 mL, acondicionando el medio para la precipitación con cloruro de bario al 3 % cuyo volumen se estima a partir de los 0,0011 pfg de ion sulfato:



Cálculo del volumen de solución de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 3 %; 100 mL de solución de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ contienen 3 g de la sal = $3/244,28 \text{ g/pfg} = 0,01228 \text{ pfg}$

Según la guía, se agregan 15 mL de la solución, equivalente a 0,001842 pfg, que representa un exceso de 0,000742 pfg = 0,18 g de cloruro de bario, en porcentaje 67,47% mientras que con 10 mL de igual solución, se obtienen 0,0015 pfg de Ba^{+2} cuyo exceso se ha considerado suficiente: es mayor que 11,65 % dado que se parte del supuesto de sal anhidra y por la baja solubilidad del precipitado de BaSO_4 , la cual, en HCl 0,3 M es de 2,9mg/100mL, medio ácido necesario para reducir la contaminación del precipitado.

En la revisión de la determinación de sílice del análisis gravimétrico de una caliza, se redujo el volumen de ácido de la forma mencionada, además de modificar el procedimiento: No se lleva a sequedad con el ácido clorhídrico (2 veces) para deshidratar el material no soluble en el ácido, en su lugar, se realiza el ataque de la muestra de caliza en condiciones moderadas de temperatura, dado que los carbonatos como el de calcio y magnesio, son solubles en estas condiciones en el ácido usado y, solo se filtra el material no disuelto.

En el método “determinación gravimétrica de níquel en aleaciones con dimetilglioxima”, la disolución de la muestra de una aleación ternaria de níquel resulta ineficiente de la forma indicada en la guía de prácticas: “se agregan 15 mL. de HCl 1:1, se calienta suavemente, hasta disolver, se agregan 3 mL. de ácido nítrico, HNO_3 1:1 y se continúa calentando hasta eliminar vapores nitrosos” Lo que sucede es que el HCl se volatiliza sin disolver la muestra, dada la característica inercia de este tipo de aleaciones. Pero si se agrega la mezcla de los ácidos diluidos clorhídrico y nítrico simultáneamente, se logra un proceso ecoeficiente de disolución.

En la determinación gravimétrica del ion ortofosfato en un mineral fosfatado con molibdato de amonio, se asume como componente principal al fosfato tricálcico, y por la posible presencia de componentes con menor peso fórmula gramo que dicho fosfato, así como pérdidas por volatilización durante la disolución y reacciones colaterales, se considera un volumen de 2 mL. de HNO_3 16 M, empleando 4 ml del diluido 1:1 (8M) en su reemplazo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las tablas siguientes, comparan el consumo de reactivos por cada estudiante, que se indica en la guía de prácticas, con las mejoras realizadas, en los métodos analíticos estudiados.

Tabla 1. Consumo de reactivos empleados en la determinación gravimétrica de sulfato en yeso como sulfato de bario, según la guía de prácticas vigente, P1 y de acuerdo a la propuesta de mejora, P2. Masa de muestra promedio 0,15 g en ambos casos.

Función del reactivo	Reactivo vol. mL	P1	P2	Ahorro	Ahorro %
Disolver la muestra	HCl 12 M	5 mL.	1 mL	4 mL	80
Neutralizar exceso de ácido	NH_3 15M	4 mL Aprox.	0,7 mL. Aprox.	3,3 mL	82,5
Ajuste de pH	HCl 12M	2 mL	2 mL	0 mL	0
Agente precipitante	BaCl_2 al 3 %	15 mL	10 mL	5 mL	33,33

Tabla 2. Consumo de reactivos para la determinación de material insoluble en ácido incluido en el análisis de una muestra de caliza. De acuerdo a la guía actual P3, según la propuesta, P4. Masa promedio de muestra 0,5 g. Reducción de ácido y modificación del procedimiento.

Función del reactivo	Reactivo vol. mL	P3	P4	Ahorro en reactivos	Ahorro %
Disolver la muestra	HCl 6 M	10 mL	4 mL	6 mL	60
Deshidratar ácido silíceo	HCl 6M	11,2 mL	0 mL	11,2 mL	100
Neutralizar exceso HCl	NH_3 15M	0,8-1 mL	0,8-1 mL	0 mL	0

Tabla 3. Consumo de reactivos en la disolución de 0,1 g de una aleación ternaria de níquel (alpaca, Zn, Cu y Ni), en el método determinación gravimétrica de níquel en aleaciones con dimetilglioxima, según procedimiento de la guía, P5 y según propuesta P6.

Función del reactivo	Reactivo vol. mL	P5	P6	Ahorro en reactivos	Ahorro %
Disolver la muestra 1 ^a adición	HCl 6 M	15 mL	Mezcla de HCl y HNO ₃ en 1 ^a adición	Evita la pérdida de HCl de la 1 ^a adición	100 % de tiempo
Disolver la muestra 2 ^a adición	HCl 6 M	10 mL	0 mL	10 mL	100
Disolver la muestra	HNO ₃ 8 M	3 mL	3 mL	0 mL	0

Tabla 4. Consumo de reactivos en la determinación gravimétrica de ion ortofosfato con molibdato de amonio, según procedimiento de la guía, P7 y según propuesta P8. Peso de muestra 0,2 g en ambos casos.

Función del reactivo	Reactivo vol. mL	P7	P8	Ahorro	Ahorro %
Disolver la muestra	HNO ₃ 16 M	5 mL	2 mL	3 mL	60
Neutralizar exceso de ácido	NH ₃ 15M	4 mL Aprox.	1 mL Aprox.	3 mL	75
Ajuste de pH	HNO ₃ 16M	0,5 mL	0,5 mL	0 mL	0

Tabla 5. Resultados analíticos, determinación gravimétrica de sulfato.

Semestre	2017-1	2018-1	2019-1	2019-1
Procedimiento	Guía	Propuesto	Propuesto	Guía
Docente	Espinosa	Espinosa	Espinosa	Rodríguez
	53,31	52,04	54,33	56,35
	54,38	56,20	55,50	51,93
	51,72	47,24	53,79	51,18
	55,13	61,42	54,38	56,98
	43,96	55,23	55,39	54,77
	53,62	53,64	53,78	54,15
	59,64	55,35	56,80	56,44
	53,11	54,26	54,38	57,88
Promedio	53,11	54,42	54,79	54,96
Desviación estándar	4,3800	3,9918	1,0332	2,4169

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1.- Respecto a los métodos estudiados y optimizados en el presente, los estimados teóricos de volúmenes de ácidos para disolver las muestras, han estado dentro de lo esperado, habiéndose comprobado experimentalmente en la práctica, dado que se sustentan en la estequiometría y la suposición de asumir la composición de la muestra como la de su sal anhidra. Los resultados de la tabla 5 corresponden a muestras de yeso analizadas por los estudiantes desde el 2017, siguiendo el procedimiento de la guía tradicional, y en 2018 y 2019 aplicando ambos procedimientos, (el de la guía y los propuestos), se puede ver que los mejores resultados (menor desviación) corresponden a 2019-1 optimizados en base a las experiencias anteriores. Los resultados de los métodos 2, 3 y 4 se consideran preliminares, en vista que corresponden a un solo semestre y a un grupo, no se han presentado, por no disponerse de resultados referenciales de los otros grupos, quedando pendiente continuar con estos ensayos.

2.-Se han logrado minimizar las emisiones de cloruro de hidrógeno, gases nitrosos y amoníaco en todas las operaciones de las prácticas, al emplear ácidos diluidos, de manera que, al manipularlos no se liberen vapores al ambiente, incluyendo el proceso de disolución realizado en condiciones de temperatura mínima, basado en la curva de solubilidad del sulfato de calcio (solubilidad máxima en agua 58°C). Disolviendo a temperaturas entre 50-60°C se minimizan las pérdidas de HCl por volatilización. Igualmente, en la determinación de fosfatos con ácido nítrico y de la aleación ternaria de níquel que no se solubiliza sólo en HCl, ya que requiere de la mezcla de ácidos HCl y HNO₃ diluidos, desde el inicio del proceso, evitándose agregar más HCl para reponer las pérdidas, además de reducir el tiempo de disolución en un 100 %.

3.-Al reducir los ácidos para disolución de muestras, en porcentajes entre 60 y 80 %, se logra ahorrar en la neutralización de los ácidos en exceso, con hidróxido de amonio NH₃, alrededor del 80 % de éste y, ajustar el pH para prevenir las interferencias y minimizar los fenómenos de contaminación de los precipitados.

4.-Además, al emplear menos ácidos y amoníaco, se reduce la concentración salina en el licor madre, disminuyendo las consecuencias desfavorables del “efecto salino” para las técnicas gravimétricas, dado que incrementa la solubilidad y los fenómenos de impurificación de los precipitados.

5.-Asimismo, la disminución de sales, favorece un proceso de filtración y lavado del precipitado y papel de filtro más eficiente, debido a la menor viscosidad del licor madre al tener menos sólidos disueltos, se reduce el tiempo de filtración y lavado al 50 % del tiempo.

6.-De acuerdo con la guía de prácticas, en la disolución del mineral fosfatado con ácido nítrico, puede quedar un residuo insoluble, el cual se filtra sin realizar un tratamiento adicional para disolver los materiales poco solubles; mientras en el caso de la caliza, se recurre a llevar a seco dos veces con HCl para deshidratar el ácido silícico liberado, empleando más HCl y tiempo. Dado que, el objetivo del análisis es disolver la caliza para determinar su pureza como CaCO₃, y su rendimiento en la producción de cal (CaO) por kg de la misma, se

propone filtrar los insolubles sin mayor tratamiento que la disolución inicial, lo cual ahorra reactivos, tiempo, y contribuye positivamente a reducir el impacto ambiental.

CONCLUSIONES

El procedimiento propuesto, es una forma sistemática para estimar los requerimientos mínimos de reactivos en un método analítico y, puede ser aplicado para optimizar, desarrollar e implementar diversos métodos analíticos, disminuir costos en reactivos y reducir los impactos ambientales que implica un consumo mayor del necesario.

También, el conocimiento adquirido permite a los estudiantes comprobar la validez de los estimados teóricos, además de demostrarles que es posible “*hacer más con menos*”: ser eco eficientes, cuestión que permite realizar una gestión ambiental adecuada, que, como futuros profesionales químicos, incidirá en disminuir los impactos de las actividades productivas en las que participe, contribuyendo, entre otras cosas, al cuidado de la salud pública.

Por otra parte, es posible reducir sustancialmente la emisión de gases y vapores durante las prácticas, al realizar cambios sencillos, como usar ácidos diluidos en lugar de concentrados, realizar las operaciones en condiciones más suaves y eficientes, sin mayor inversión de capital, traducidas en ahorro que podría ser invertido en mejorar las instalaciones del laboratorio, referidas anteriormente.

Mediante los resultados de los estudios que se han mostrado, la autora demuestra la necesidad de impartir educación ambiental transversalmente, en todos los cursos, tanto teóricos como prácticos, con enfoque en el conocimiento de los problemas reales de cada campo profesional como un aspecto esencial para promover la formación integral de profesionales que sean agentes de cambio, y líderes capaces de asumir su responsabilidad ambiental en el ámbito de las actividades educativas y su proyección hacia las productivas.

AGRADECIMIENTO

Mi mayor reconocimiento y agradecimiento al Ingeniero Jorge Eduardo Loayza Pérez por su apoyo constante y desinteresado durante la elaboración de las principales partes de la tesis de maestría. Al Ingeniero Fernando Anaya Meléndez, coordinador del Departamento de Química Analítica en 2018, por darme las facilidades para realizar la revisión de los métodos analíticos. A la Química María Angélica Rodríguez Best, por compartir los resultados analíticos de sus estudiantes, quienes aplicaron las instrucciones de la guía y me apoyaron en las encuestas de referencia.

Al Ingeniero Manuel Yáñez y a mi querida hija Angélica por el invaluable e incondicional apoyo de siempre.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MINAM. Ley de Recursos Hídricos, N° 29338. [Internet] 2009, artículos 75,76,79,80-82 [Citado 12 jun 2020]. Disponible en: <https://sinia.minam.gob.pe/normas/ley-recursos-hidricos-0>
2. Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento. Decreto Legislativo N° 1285. [Internet] Lima, 2016. [Citado 22 julio 2020]. Disponible en: http://nike.vivienda.gob.pe/dgaa/Archivos/DL_1285.pdf
3. Guías de prácticas de laboratorio del curso Química Analítica Cuantitativa del Departamento Académico de Química Analítica de la EP Química de la UNMSM, de los semestres 2017-1, 2018-1, 2019-1 y 2020-1. Lima: EP Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
4. Kolthoff I, Sandell E, Meehan E y Bruckenstein S. Quantitative Chemical Analysis. New York: Macmillan Company; 1969.
5. Harris D. Análisis Químico Cuantitativo. Barcelona: Editorial Reverté; 2012.
6. Erazo M, Cárdenas R. Ecología. Impacto de la problemática ambiental actual sobre la salud y el ambiente. Bogotá: ECOE Ediciones; 2015.
7. Alberta Environmental Protection Agency. Waste Minimization Manual for Analytical Laboratories. Edmonton: Alberta Environmental Protection Agency; 1990. AB T5K 2J6.
8. American Chemical Society (ACS). Waste Management Manual for Laboratory Personnel. Washington, D.C.: American Chemical Society; 1990.
9. Work Team of the Environment, Health and Safety laboratory and the American Chemical Society (ACS). Less is Better. A Guide for the Minimization of Waste in Laboratories. Washington, D.C.: American Chemical Society; 2002.
10. Loayza J, Silva M, Galarreta H. Gestión Integral de Residuos Químicos en el Laboratorio. Revista Peruana de Ingeniería Química. 2005; 8 (2): 53-60
11. Robustillo A. Estudio de la solubilidad de carbonatos y sulfatos con implicancia en la formación de "Scales". [Tesis de pregrado]. Madrid: Universidad Rey Juan Carlos; 2009.
12. de la Guardia M, Armenta S. Green Analytical Methods. Anal Bioanal Chem. 2012; 404: 625-626.

REÚSO EN PROCESOS DE BLANQUEO TEXTIL DE LOS EFLUENTES PROVENIENTES DE TINTURAS CON COLORANTES REACTIVOS NEGROS DECOLORADOS MEDIANTE EL MÉTODO DE FENTON

Carmen L. Uribe Valenzuela^a, Melissa J. Caballero Bustos^a,
Percy O. Cárdenas Torres^b, Emilia G. Hermoza Guerra^b

RESUMEN

Se reusaron efluentes textiles provenientes de teñidos negros reactivos, decolorados por el método de oxidación avanzada Fenton en procesos de blanqueo de fibra celulósica por agotamiento. Se recolectaron efluentes textiles provenientes de dos teñidos reactivos negros: Corafix Black SD y Corazol Black B 133 %, simulados y reales, para ser decolorados con el tratamiento Fenton. Se monitoreó la decoloración usando espectrofotometría UV-visible, se determinaron las proporciones óptimas de reactivo Fenton (sal de Fe (II) (g)/H₂O₂ (mL)): 0,0156 g/mL y 0,0251 g/mL con un tiempo de reacción de 90 minutos y pH óptimos de tratamiento de 3,70 y 3,88 para los efluentes textiles provenientes de teñido con colorantes Corafix Black SD y Corazol Black B 133%, respectivamente. Los efluentes tratados se caracterizaron, adecuaron y usaron en el blanqueo de tejidos celulósicos. Se obtuvo textiles con un grado de blancura de 74,73 °Be y 73,41 °Be, similares al sustrato blanqueado con agua blanda (76,61°Berger). Se compararon: las curvas de reflectancia con el espectrofotómetro Datacolor SF550, hidrofiliidad y capilaridad según métodos normalizados. Finalmente se concluyó que el tratamiento Fenton es viable para este tipo de efluentes negros reactivos, pues se obtuvieron sustratos blanqueados con propiedades similares al blanqueo con agua blanda.

Palabras clave: efluente textil, Fenton, blanqueo químico, colorante reactivo.

^a Escuela Profesional de Ingeniería Textil de la Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú, curibe@uni.edu.pe

^b Escuela Profesional de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú.

REUSE IN TEXTILE BLEACHING PROCESSES OF EFFLUENTS FROM DYEING WITH REACTIVE BLACK DYES DECOLORED BY THE FENTON METHOD

ABSTRACT

Textile effluents from reactive black dyes, decolorized using the advanced Fenton oxidation method, were reused in cellulosic fiber exhaustion bleaching processes. Textile black reactive effluents were collected, provided from two recipes of reactive blacks; Corafix Black SD (Black SD) and Corazol Black B 133 % (Black 5), simulated and real, due to being decolorized by the Fenton treatment. The discoloration was monitored using UV-visible spectrophotometry, the optimal proportions of Fenton reagent (Fe (II) salt (g) / H₂O₂ (mL)) were determined: 0,0156 g / mL and 0,0251 g / mL with 90 minutes of reaction time, and optimal treatment pH of 3,70 and 3,88 for textile effluents from dyeing with Corafix Black SD and Corazol Black B 133 % dyestuffs respectively. The decolorized effluents were characterized, adequated, and used in bleaching of cellulosic fabrics. Textiles with a degree of whiteness of 74,73 °Be and 73,41 °Be were obtained, similar to the substrate bleached with soft water (76,61 °Be). The reflectance curves were compared with the Daticolor SF550 spectrophotometer, hydrophilicity and capillarity according to standardized methods. Finally, it was concluded that the Fenton treatment is viable for this type of reactive black effluent since bleached substrates with properties similar to bleaching with soft water were obtained.

Key words: textile effluent, Fenton, bleaching, reactive dyestuff.

INTRODUCCIÓN

La industria textil es uno de los sectores productivos de mayor consumo de agua, consumiendo desde 30 a 150 L/kg material textil acabado¹. Actualmente, las normativas medioambientales, la escasez y el encarecimiento del recurso hídrico obligan al ahorro de agua en los procesos textiles. Las tintorerías textiles aparte de consumir altos volúmenes de agua, generan efluentes con distintas concentraciones de colorantes y químicos, los cuales ocasionan impactos negativos al ambiente si no son gestionados adecuadamente antes de verterse al alcantarillado y posteriormente a los ríos y océanos.

Los colorantes reactivos son los más usados para el teñido del algodón y generan efluentes problemáticos debido al bajo poder de agotamiento y fijación en la fibra. El colorante no fijado se encuentra en altas concentraciones en los efluentes textiles², por consiguiente, es un efluente no sólo difícil de tratar sino también de reusar.

Los procesos de oxidación avanzada son aquellos tratamientos terciarios que usan oxidantes (químicos) para reducir los niveles DQO/DBO, y para separar los componentes orgánicos

y los componentes inorgánicos oxidables³. El método Fenton es uno de los tratamientos de oxidación avanzada que ha mostrado buenos resultados para la decoloración de colorantes azoicos⁴.

Se seleccionó el método Fenton para la decoloración ya que es uno de los procesos más económicos y efectivos, que consiste en la adición de sales de hierro en medio ácido para promover la descomposición catalítica del peróxido de hidrógeno en radicales hidroxilo HO•, los cuales son capaces de oxidar la materia orgánica y los compuestos inorgánicos, tales como sulfuros presentes en el agua residual⁵.

Entre los procesos textiles de mayor importancia se encuentra el ennoblecimiento textil que abarca: teñido, estampados y acabados. Entre los procesos previos al teñido tenemos uno de los más empleados en la industria textil: el blanqueo con peróxido de hidrógeno, que tiene por objetivo remover las impurezas, pigmentos naturales del sustrato y conferir una hidrofiliadad que le permita al textil ser teñido sin inconvenientes. El enfoque del proyecto se basó en este proceso ya que es uno de los procesos fundamentales para cualquier tratamiento de teñido y/o ennoblecimiento textil.

PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental fue realizada en los laboratorios de las Escuelas Profesionales de Ingeniería Química e Ingeniería Textil de la Universidad Nacional de Ingeniería, debido al enfoque multidisciplinario de la investigación esta fue estructurada en dos etapas.

Primera etapa: Decoloración del efluente textil

Consistió en el tratamiento químico de los efluentes textiles, considerando como variable la dosificación del reactivo Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$), y como parámetros fijos la velocidad de agitación (rpm) y la temperatura. Las características de los efluentes textiles reales (ER) provenientes del proceso de teñido con los colorantes reactivos Corafix Black SD (Black SD) y Corazol Black B 133% (Black 5) fueron las siguientes, DQO: 1337,5 mg/L y 3525,0 mg/L, pH: 11,46 y 12,60, respectivamente. Los espectros UV-vis de ambos efluentes se muestran en la figura 1, fueron obtenidos con un espectrofotómetro UV-visible Shimadzu 1601.

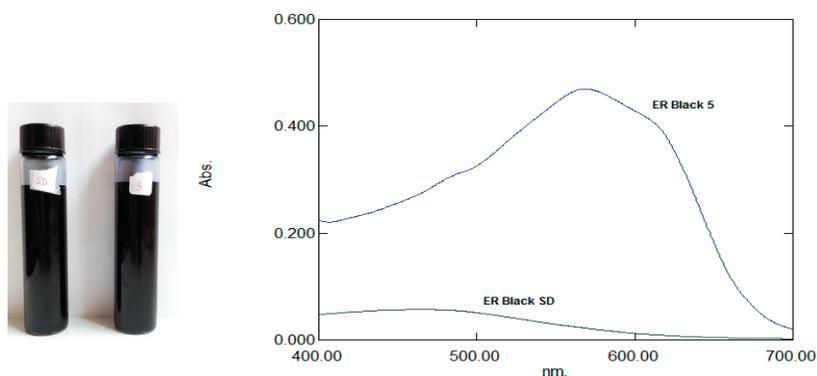


Figura 1. Izquierda. (a) Efluente real del colorante reactivo Corafix Black SD, (b) Efluente real del colorante reactivo Corazol Black B 133 %. Derecha. Espectros UV-vis de los efluentes reales (ER) de los colorantes Black SD y Black 5 diluidos 2:250.

La decoloración de los colorantes negros reactivos se realizó en medio ácido. La acidificación del efluente real a tratar se hizo con H_2SO_4 18M. En pruebas preliminares se comprobó la decoloración de los efluentes textiles simulados al aplicar el tratamiento Fenton a $\text{pH}=2,8^{3,4}$. Este pH sirvió como punto inicial para aplicar este tratamiento a los efluentes reales y ensayar el blanqueo de sustratos textiles con el efluente tratado. El pH fue ajustado hacia valores mayores hasta lograr un grado de blanco aceptable en sustratos textiles, encontrándose los siguientes valores óptimos: $\text{pH}=3,70$ para el colorante Black SD y $\text{pH}=3,88$ para el colorante Black 5.

La dosificación de reactivo Fenton (peróxido de hidrógeno grado industrial al 50 % y sulfato ferroso heptahidratado al 99,5 %) se determinó en base al DQO según Rodríguez *et al.*⁶. El efluente tratado se neutralizó con NaOH 9M a fin de formar y precipitar el hidróxido férrico, el cual fue separado mediante filtración al vacío.

Tratamiento óptimo

Se escaló hasta 200 mL de efluente textil real con peróxido de hidrógeno al 50 % de grado industrial, la velocidad de agitación fue de 150 rpm y tiempo de tratamiento de 90 min en un equipo agitador orbital. En la tabla 1 se muestra la caracterización antes del tratamiento y las tres dosis de reactivo Fenton ensayadas para los dos tipos de efluentes textiles reales con los colorantes reactivos. Para el efluente del colorante Black SD las pruebas preliminares A, B y C se denominaron PP1A, PP1B, PP1C; mientras que para el efluente del colorante Black 5 las pruebas 1, 2 y 3 se denominaron: P1, P2 y P3.

Tabla 1. Caracterización de los efluentes reales que contienen colorantes reactivos negros antes del tratamiento y dosificación del reactivo Fenton para 200 mL de efluente.

	Colorante Black SD			Colorante Black 5		
	PP1A	PP1B	PP1C	P1	P2	P3
pH inicial	11,46	11,46	11,46	12,60	12,60	12,60
Conductividad (mS)	132,1	132,1	132,1	116,6	116,6	116,6
ORP (mV)	-63,3	-63,3	-63,3	-75,5	-75,5	-75,5
pH acondicionado	3,70	3,70	3,70	3,88	3,88	3,88
Masa de FeSO ₄ ·7H ₂ O(g)	1,00	0,292	0,280	0,23	0,47	0,75
H ₂ O ₂ 50 % V/V (mL)	20,00	18,70	14,00	18,70	18,70	18,70
Sal de Fe (II) (g) / H ₂ O ₂ (mL)	0,050	0,0156	0,020	0,0123	0,0251	0,0401

Segunda etapa: Reúso

Se caracterizaron el efluente textil tratado por el tratamiento Fenton y el sustrato textil de algodón crudo. Se definió la receta y la curva de proceso para los ensayos de blanqueos con los efluentes tratados. Finalmente, estos sustratos blanqueados fueron comparados respecto al sustrato blanqueado con agua blanda, denominado blanco estándar, mediante normas y lecturas en el espectrofotómetro de reflectancia.

Caracterización del efluente tratado

Se determinaron las siguientes características de los efluentes tratados por el tratamiento Fenton: Residuos no volátiles (NVR), pH, dureza (ppm de Ca²⁺ y ppm de Mg²⁺) para cada uno de los efluentes provenientes de tinturas reactivas con los colorantes Black SD y Black 5. Estas características están ligadas al rendimiento del blanqueo de algodón y su evaluación permite asegurar la viabilidad del proceso de blanqueo a partir de estos efluentes tratados, esto se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Características de los efluentes textiles tratados antes de su aplicación en procesos de blanqueo.

Procedencia del efluente	Residuos no volátiles (NVR)	pH	Dureza (ppm)	Fe (ppm)
Corazol negro B 133 % (Black 5)	11,55	7,50	11,37	5,63
Corafix negro SD (Black SD)	11,10	7,32	10,53	3,77

Caracterización del sustrato textil

Se seleccionó un sustrato estándar de fibra celulósica: tejido crudo de ligamento jersey, título 30/1 Ne, de composición 100 % algodón y gramaje 141 g/m². En la tabla 3 se muestran las características del tejido crudo que se usó en las pruebas de blanqueo a nivel laboratorio con agua blanda y con el efluente tratado con reactivo Fenton.

Tabla 3. Características del tejido crudo de algodón antes del proceso de blanqueo.

Característica	Método de ensayo- Norma	Valor obtenido
pH de extracción de la tela	AATCC 81-2012	8,14
Hidrofilidad	AATCC 79-2014	mayor a 1 hora
Capilaridad	AATCC 197-2013	0 cm en 30 min

Proceso estándar de blanqueo químico del algodón

Se determinó la receta del blanqueo de algodón por agotamiento, tabla 4, la cual fue usada en todos los ensayos.

Tabla 4. Receta del proceso blanqueo químico del algodón por agotamiento.

Producto	Función	Concentración
Blanqueo químico (98°C, 45 min):		
Goldpal DNF-EL	Detergente /Humectante	1,00 g/L
Goldwhite SB2	Estabilizador de H ₂ O ₂	2,00 g/L
Peróxido de hidrógeno 50 %	Agente oxidante	4,00 %
Hidróxido de sodio 50°Be	Álcali	2,00 g/L
Neutralizado (50°C, 10 min):		
Ácido acético 100 %	Ácido	1,00 g/L
Eliminación de residual de peróxido de hidrógeno (40°C, 10 min):		
Goldgreen BIO-P	Degradación del oxidante	1,00 %

En la figura 2 se detalla la curva estándar del proceso de blanqueo químico para el algodón usado tanto para el blanco estándar como para los blanqueos con los efluentes textiles tratados.

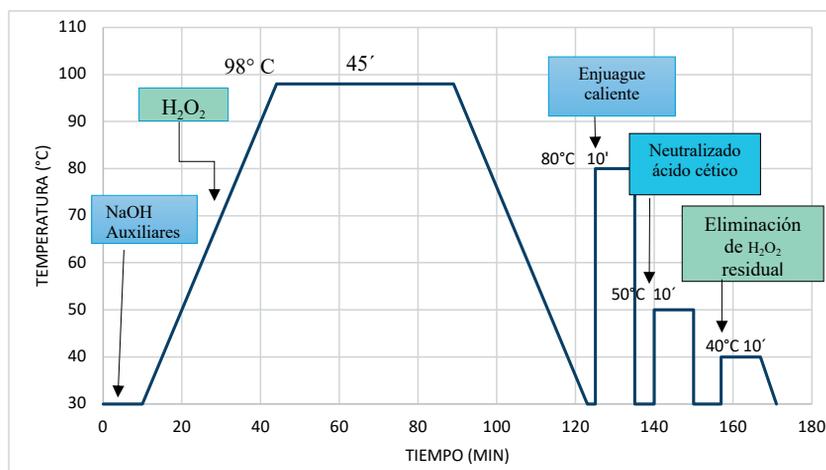


Figura 2. Curva estándar del proceso de blanqueo químico de algodón.

Se realizaron las pruebas del proceso de blanqueo por agotamiento en la máquina de teñido con agitación vertical con glicerina como medio de calentamiento ubicada en el Laboratorio 24. Posteriormente se evaluó el blanqueo estándar y los blanqueos a partir de los efluentes textiles tratados en la cabina de luces de manera visual bajo luz D65 e instrumentalmente con el espectrofotómetro de reflectancia Datacolor SF 550. Se evaluaron características físicas tales como: igualación, hidrofiliidad, capilaridad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Decoloración con método Fenton

Las pruebas preliminares de decoloración de los efluentes textiles simulados mediante el método Fenton, permitieron establecer un punto de partida para los ensayos de decoloración de los dos efluentes reales de tinturas de celulosa con colorantes reactivos usados en la industria textil: Black SD y Black 5. Al realizar los ensayos de blanqueo con los efluentes reales tratados a pH=2,8^{3,4} se obtuvo un grado de blanco Berger no satisfactorio en los sustratos celulósicos comparados con el blanco estándar con agua blanda (76,61°Be). Tomando en cuenta la experiencia de otros autores^{9,10,13} se ajustó el pH a valores mayores y se encontró los siguientes valores óptimos: pH=3,70 y pH=3,88 para Black SD y Black 5 respectivamente. En la tabla 5 se listan seis investigaciones con valores de pH>2,8 para tratamientos Fenton aplicados a colorantes reactivos donde se lograron resultados aceptables en la remoción del color y en la reducción de la DQO.

Tabla 5. Colorantes reactivos para celulosa tratados con el reactivo Fenton a distintos valores de pH óptimos.

Colorante	pH óptimo	Fuente
Amarillo 160, Azul 81, Rojo 190	3,50	Terán, Posligua & Banchón, 2015 ⁸
Reactive Black 5	3,0-3,5	Meric, Kaptan & Olmez, 2004 ⁹
Reactive Black 5	4,00	Ribeiro, Andrade & Toshio, 2015 ¹⁰
Reactive Blue 15	3,15	Clemente, 2008 ¹¹
Reactive Blue, Sunfix Ruby, Yellow	3,50	Gutierrez, 2015 ¹²
Reactive Black 5	3,00	Lucas & Peres, 2006 ¹³

Se puede decir que al ser un efluente textil real un sistema multicomponente, el valor recomendado de pH=2,8 para evitar la formación y precipitación del Fe(OH)₃ no es necesariamente el mejor, pues pueden hallarse algunos componentes que estabilicen a la especie Fe³⁺ a pH mayores. En el caso de hierro inmovilizado en films de acetato de celulosa del grupo de Ribeiro¹⁰ se alcanzó un pH=4 sin precipitación de Fe(OH)₃. Realizar el tratamiento Fenton a pH mayores que 2,8 es ventajoso para los casos en estudio porque al llevarlos a la escala industrial significaría un ahorro de reactivos en el proceso de acondicionamiento de los efluentes textiles cuyo pH inicial es mayor que 11.

Se procedió a la neutralización y filtración de los efluentes textiles tratados para retirar las especies de hierro, indeseables en el blanqueo químico de fibra celulósica. Se notó un color amarillo pálido en el efluente real tratado del colorante Black 5, mas no en el colorante Black SD, esto podría estar asociado al mayor contenido de hierro remanente luego de la precipitación por neutralización (ver tabla 2). En la tabla 6 se muestra la caracterización de los efluentes tratados según las condiciones óptimas de pH y dosificación de reactivo Fenton. Se puede observar que los valores de ORP son positivos lo que está en relación con el poder oxidante del peróxido de hidrógeno remanente.

Tabla 6. Caracterización de los efluentes reales después del tratamiento Fenton (90min), luego de neutralizar y filtrar.

	Prueba Black SD			Prueba Black 5		
	PP1A	PP1B	PP1C	P1	P2	P3
pH final (neutralizado)	7,32	7,32	7,32	7,02	7,27	7,44
Conductividad (mS)	120,4	117,5	117,7	118,9	123,5	126,8
ORP (mV)	261,6	250,8	165,6	84,2	312,7	294,9

También se obtuvieron los espectros UV-visible que se muestran en las figuras 3 y 4, colorante Black 5 y Black SD, respectivamente. Se apreció una notable disminución de la absorbancia al comparar los espectros UV-vis del colorante Corazol Black B 133 % (Black 5) antes y después del tratamiento de decoloración (figura 1 derecha y figura 3), esto a causa del rompimiento de enlaces por la oxidación de la materia orgánica. El punto óptimo de tratamiento se asignó al de mínima absorbancia, que fue la prueba P2 (figura 3) con una relación de reactivo Fenton (sal de Fe (II) (g) / H₂O₂ (mL)) de 0,0251 g/mL a un pH acondicionado de 3,88.

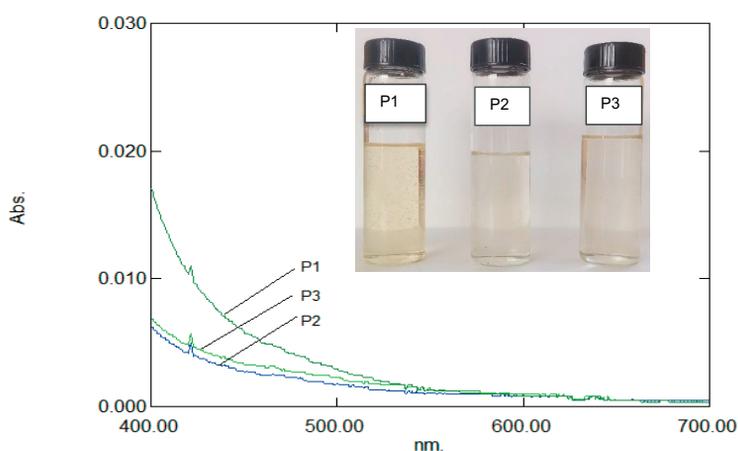


Figura 3. Espectros UV-vis del efluente real después del tratamiento Fenton del colorante Corazol Black B 133 % (Black 5) para las pruebas P1, P2, P3 diluidos 2:25, respectivamente.

En la figura 4 del análisis del espectro obtenido del colorante Corafix Black SD (Black SD) después del tratamiento de decoloración y en comparación con su espectro inicial (figura 1, derecha), también se observó una disminución apreciable de la absorbancia llegando a valores menores al 0,01 en el rango visible, resultando óptimo el tratamiento con una relación de reactivo Fenton (sal de Fe(II) (g) / H₂O₂ (mL)) de 0,0156 g/mL, correspondiente a la prueba PP1B a un pH acondicionado de 3,70.

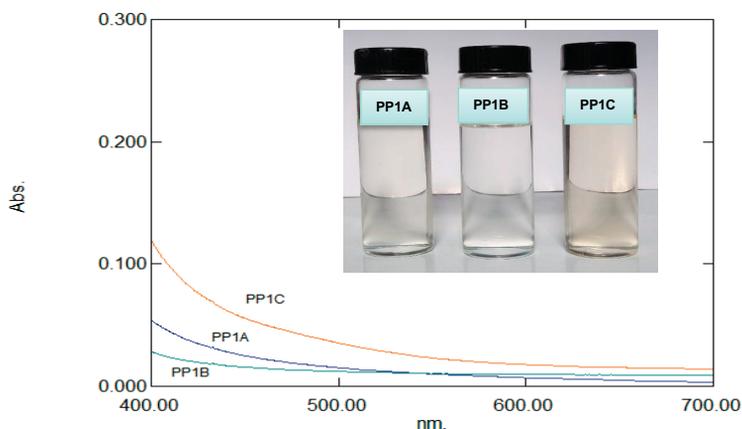


Figura 4. Espectros UV-vis del efluente real después del tratamiento Fenton del colorante Corafix Black SD (Black SD) usando H₂O₂ 50 % industrial para las pruebas PP1A, PP1B, y PP1C.

Se observa en la zona ultravioleta de las figuras 5 y 6, un cambio en el perfil del espectro de los efluentes reales tratados respecto a los iniciales y la existencia de un pico remanente después del tratamiento Fenton en las condiciones óptimas. Se infiere que hay una mineralización incompleta, esto debido a que existe la inhibición del Fe(III) con H₂O₂, lo que dificulta la formación de •OH, pudiéndose formar complejos de iones de hierro cuando se alcanzan pH menores a 2,5 al terminar el tratamiento.^{3,4}

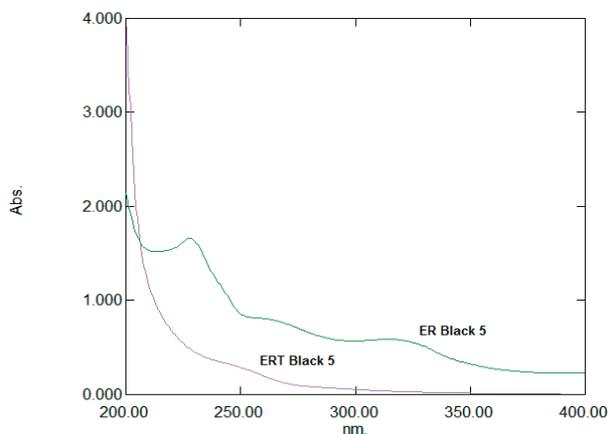


Figura 5. Espectros UV-vis del efluente real antes (ER Black 5 diluido 2:250) y después del tratamiento (ERT Black 5 diluido 2:25) Fenton del colorante Corazol Black B 133 %.

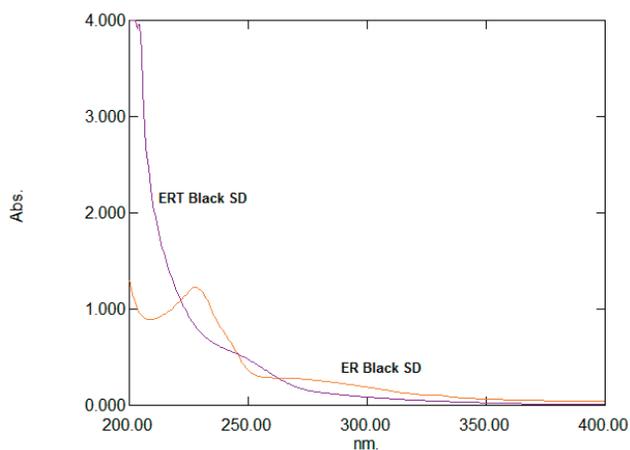


Figura 6. Espectros UV-vis del efluente real antes (ER Black SD diluido 2:250) y después del tratamiento (ERT Black SD diluido 2:25) Fenton del colorante Corafix Black SD.

Reúso de efluentes en procesos de blanqueo químico por agotamiento

Posterior al proceso de blanqueo químico a partir efluentes reales tratados con diferentes dosis del proceso Fenton se obtuvieron los siguientes resultados para el blanqueo a partir de efluentes decolorados del colorante Black 5 que se muestran en la tabla 7. Las pruebas de blanqueo Pi N°1 y Pi N°2 fueron las pruebas iniciales a partir de un volumen de 50 mL. En el tercer grupo de pruebas se realizó un blanqueo con la dosificación Fenton ajustada de 0,0251 g/mL, según la tabla 1, para el colorante Black 5. Para demostrar su reproducibilidad se repitió 3 veces el mismo blanqueo y se evidenció que fue la mejor dosificación al obtener el tejido de algodón con el mejor grado de blanco (73,41°Be) y se le denominó prueba Pi*N°3.

Tabla 7. Grado de blanco Berger ($^{\circ}\text{Be}$) de los tejidos de algodón blanqueados a partir de efluentes textiles decolorados del Corazol Black B 133 % (Black 5) y el blanco estándar.

Prueba	L	C	h	Grado de Blanco ($^{\circ}\text{Be}$)
Estándar	93,23	6,24	90,76	76,61
Pi N $^{\circ}$ 1	83,38	8,11	75,02	54,36
Pi N $^{\circ}$ 2	83,38	8,11	75,02	50,04
Pi*N $^{\circ}$ 3	92,26	3,39	95,01	73,41

Se obtuvieron las gráficas de las curvas espectrales de reflectancia a lo largo del rango de longitud de onda del espectro visible para las pruebas iniciales (Pi) ensayadas en un volumen de 50 mL a partir de una dosificación inicial de Fenton, la cual no dio resultados positivos ya que persistió la coloración en el agua tratada. No se logró el grado de blanco y los resultados de capilaridad e hidrofiliadad fueron mínimas en los tejidos y casi inexistentes ya que un textil al ser sometido a un proceso de blanqueo tan enérgico como éste debió presentar propiedades óptimas de capilaridad e hidrofiliadad. La dosificación Fenton ajustada dio un mejor grado de blanco y un acercamiento al color del blanco estándar, esto se puede apreciar en la curva de reflectancia mostrada en la figura 7, determinándose al tejido blanqueado prueba Pi*N $^{\circ}$ 3 como el más próximo al blanco estándar.

Curva de reflectancia de los sustratos blanqueados a partir del colorante reactivo black 5

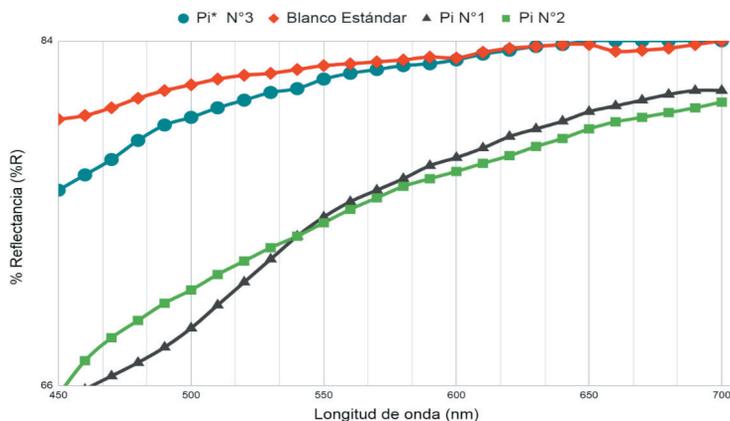


Figura 7. % Reflectancia vs. Longitud de onda (nm) de los tejidos de algodón blanqueados a partir de efluentes decolorados del colorante reactivo Corazol Black B 133% (Black 5) y el blanco estándar.

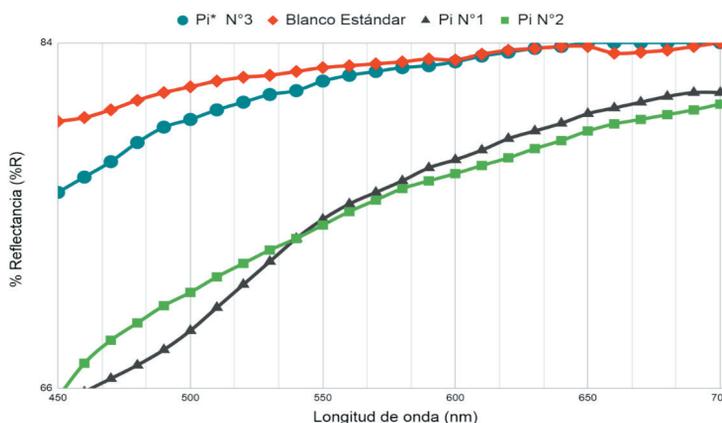
Posterior al proceso de blanqueo a partir efluentes reales decolorados del colorante Black SD tratados con diferentes dosis de Fenton se obtuvieron sustratos textiles blanqueados mostradas en la tabla 8. La muestra textil denominada PP B es la que presenta el mejor grado de Blanco (74,73 $^{\circ}\text{Be}$) y se obtuvo con el efluente tratado con dosificación Fenton ajustada de 0,0156 g/mL según la tabla 1 para el colorante Black SD.

Tabla 8. Grado de blanco Berger ($^{\circ}\text{Be}$) de los tejidos de algodón blanqueados a partir de efluentes textiles decolorados del Corafix Black SD (Black SD) y el blanco estándar.

Prueba	L	C	h	Grado de Blanco $^{\circ}\text{Be}$
Estándar	93,23	6,24	90,76	76,61
PPi 1	80,44	8,99	89,33	61,26
PPi 2	90,43	5,24	85,37	63,09
PP B	92,93	6,26	90,78	74,73

Finalmente, se obtuvieron las curvas espectrales de reflectancia de los blanqueos a partir de efluentes textiles reales decolorados del colorante reactivo Black SD y del blanco estándar que se muestran en la figura 8. Se observa que la PP B es la muestra textil más parecida en color al blanco estándar.

Curva de reflectancia de los sustratos blanqueados a partir del colorante reactivo black 5

**Figura 8.** % Reflectancia vs. Longitud de onda (nm) de los tejidos de algodón blanqueados a partir de efluentes decolorados del colorante reactivo Corafix Black SD (Black SD) y el blanco estándar.

Evaluación de calidad de los tejidos blanqueados

Se repitieron las pruebas de blanqueo y se realizó el control de calidad según las normas internacionales que son aplicadas en las empresas textiles peruanas para determinar otras características, incluso más importantes que el grado de blanco como: la hidrofiliidad, que se aprecia en la figura 9, capilaridad, mostrada en la figura 10 y la tabla 9, que determinaron que el proceso de blanqueo fue efectivo para la remoción de impurezas, ceras y/o aceites.

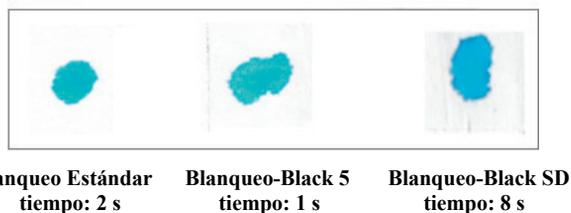


Figura 9. Resultados de la prueba de hidrofiliad (Norma AATCC 79-2014) del Blanqueo estándar vs. Blanqueos a partir de efluentes tratados de colorante reactivo Black 5 y efluentes de colorante reactivo Black SD en las pruebas con resultados óptimos.

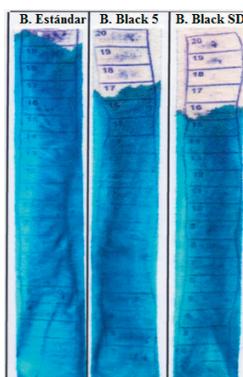


Figura 10. Capilaridad (Norma AATCC 197-2013) de la tela blanqueada estándar vs. Blanqueos con efluentes Black 5 y Black SD con resultados óptimos.

Tabla 9. Resultados de la capilaridad según Norma AATCC 197-2013 con resultados óptimos para las 3 muestras a los 5 minutos todas subieron más de 6 cm.

Tiempo (min)	Blanqueo Estándar (cm)	Blanqueo-Black 5 (cm)	Blanqueo-Black SD (cm)
1	5,0	5,5	4,5
3	7,5	7,2	6,2
5	9,0	8,5	7,5
30	19,0	16,5	16,0

CONCLUSIONES

- La decoloración de los efluentes textiles reales mediante el método Fenton es una propuesta viable para tratar estos efluentes de tinturas con colorantes reactivos y su posterior reúso en procesos de blanqueo químico con características similares en capilaridad e hidrofiliidad y con respecto a tono, para los dos tipos de efluentes se obtuvieron valores óptimos similares al blanqueo estándar.
- El método Fenton es eficaz para el tratamiento de estos tipos de colorantes reactivos, siendo 0,0156 g/mL y 0,0251 g/mL las relaciones óptimas del reactivo Fenton en un tiempo de reacción de 90 min, con pH óptimos de tratamiento de 3,70 y 3,88 para los efluentes textiles provenientes de teñido con colorantes Corafix Black SD (Black SD) y Corazol Black B 133 % (Black 5), respectivamente.
- El tejido celulósico blanqueado a partir de efluentes textiles reales del colorante Black 5 decolorados con el método Fenton, tuvo un tiempo de hidrofiliidad de 12 segundos, capilaridad de 14 cm a los 30 minutos y un grado de blanco de 73,41 °Be, similar al blanqueo estándar con agua blanda (76,61 °Be). Por lo tanto, el grado de blanco de los sustratos textiles celulósicos no se altera usando baños tratados con las dosificaciones óptimas de Fenton aún si el tratamiento no completó la mineralización del efluente.
- Asimismo, con los efluentes textiles reales del colorante Black SD se obtuvo un tejido celulósico blanqueado con propiedades similares al obtenido con los efluentes textiles reales del Black 5.
- Por lo tanto, se puede inferir que un teñido a partir de estos sustratos textiles blanqueados con efluentes reales decolorados con el método Fenton darían resultados similares a teñidos a partir de sustratos blanqueados con agua blanda.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Química y Textil de la UNI por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación. Al Ing. Javier Cárdenas, Jefe del Laboratorio de Química Aplicada de la FIQT, al Ing. Rigoberto Marín, Jefe del Laboratorio Textil N°24 de la FIQT por las facilidades brindadas para la realización de los ensayos y a la empresa Coltex Perú S.A. por facilitarnos las muestras de los colorantes en estudio y los efluentes reales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sánchez CM. La industria textil, la segunda más contaminante del mundo. [Internet]. XL Semanal [citado 18 de enero 2020]. Disponible en: <https://www.xlsemanal.com/actualidad/20160913/cataclismo-la-fast-fashion.html>
2. Kolorjet Chemicals Pvt. Ltd. Textile Dyes. Dyes & Pigments. Mumbai: Kolorjet Chemicals Pvt. Ltd. Textile Dyes; 2010.
3. Blanco Jurado J. Degradación de un efluente textil real mediante procesos Fenton y Foto-Fenton [Internet] [Tesis de máster]. Barcelona: UPC, Escola Tècnica Superior d'Enginyers de Camins, Canals i Ports de Barcelona; 2009 [citado 1 octubre 2020]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2099.1/8325>
4. Gamarra C, La Rosa-Toro A. Decoloración del anaranjado de metilo empleando el sistema Fenton. *Rev Soc Quim Perú*. 2014; 80: 21-34.
5. García J, Castellanos M, Uscátegui Ángela, Fernández J, Pedroza A, Daza C. Remoción de colorantes sintéticos mediante el proceso Fenton heterogéneo usando Fe₂O₃ soportado en carbón activado obtenido a partir de residuos de rosas. *Univ Sci*. [Internet] 2012; 17: 303-314. [Citado 2 octubre 2020]. Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4035>
6. Rodríguez R, Flesler F, Lehmann V. Oxidación avanzada Sistema Fenton en tratamiento de efluentes industriales de alta carga orgánica. *Inti Ambiente*. 2010; 1-2.
7. Nichela DA. Estudio del mecanismo y la cinética de degradación de contaminantes aromáticos. [tesis de doctorado]. La Plata: Universidad Nacional de La Plata; 2012.
8. Terán G, Posligua P, Banchón C. Dosificación mínima del reactivo Fenton para la remediación de agua contaminada con colorantes. *Enfoque UTE*. 2015; 6: 65-80.
9. Meric S, Kaptan D, Ölmez T. Color and COD removal from wastewater containing Reactive Black 5 using Fenton's oxidation process. *Chemosphere*. 2004; 54: 435-441.
10. Ribeiro K, de Andrade MT, Fujirawa ST. Preparation and application of cellulose acetate/Fe films in the degradation of Reactive Black 5 dye through photo-Fenton reaction. *Environ Technol*. 2016; 37: 1664-1675.
11. Clemente JP. Aplicación de procesos de oxidación avanzada (Fotocatálisis solar) para tratamiento y reutilización de efluentes textiles. [Tesis doctoral]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2008.
12. Gutiérrez CC. Sistema Fotoquímico para el tratamiento de agua residual textil sintética con contaminantes orgánicos persistentes. [Internet] [Proyecto de Investigación]. Callao: Universidad Nacional del Callao; 2015 [Citado 12 setiembre 2020]. Disponible en: <http://repositorio.unac.edu.pe/handle/UNAC/1003>
13. Lucas M, Peres J. Decolorization of the azo dye Reactive Black 5 by Fenton and photo-Fenton oxidation. *Dyes Pigm*. 2006; 71: 236-244.

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DE COBALTO CON PIRAZINAMIDA

Natalia Karolina Chávez Llalire^a, Rocío Isabel Ramírez Panti^a, Patricia Sheen Cortovarría^b, Mirko Juan Zimic Peralta^b, Ana Cecilia Valderrama Negrón^{a*}

RESUMEN

En este estudio se han sintetizado dos nuevos compuestos de coordinación de cobalto con pirazinamida: Co-PZA (1) y Co-PZA (2), a partir de dos sales precursoras de cobalto y el fármaco pirazinamida. El objetivo de este estudio ha sido elucidar la estructura química de cada complejo sintetizado mediante el uso de las técnicas de caracterización conocidas, así como evaluar y comparar su actividad biológica respecto al fármaco libre pirazinamida. Con respecto a la caracterización, se usaron las técnicas de análisis elemental de C, H y N, espectroscopía de absorción atómica de cobalto, análisis termogravimétrico, susceptibilidad magnética, espectroscopía de UV-Visible, infrarrojo y Raman. La actividad biológica fue evaluada determinando la concentración mínima inhibitoria en cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*. La fórmulas moleculares propuestas a partir de los resultados de la caracterización fueron: $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ para el complejo Co-PZA (1) y $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ para el complejo Co-PZA (2). Los dos complejos presentaron mayor capacidad antimicrobiana que pirazinamida.

Palabras clave: cobalto, pirazinamida, tuberculosis.

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF COBALT WITH PYRAZINAMIDE COORDINATION COMPOUNDS

ABSTRACT

In this study, two new cobalt with pyrazinamide (PZA) coordination compounds: Co-PZA (1) and Co-PZA (2) were synthesized from two cobalt precursor salts. The aim of this study is to elucidate the chemical structure of each synthesized complex by using characterization

^a Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Rímac, Lima, Perú, anitacvn29@yahoo.com.mx.

^b Unidad de Bioinformática y Biología Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, SMP, Lima, Perú.

techniques, as well as to evaluate their anti-tuberculous activity compared to pyrazinamide. The characterization techniques comprised, C, H and N elemental analysis, atomic absorption spectroscopy of cobalt, thermogravimetric analysis, magnetic susceptibility, UV-Visible, infrared and Raman spectroscopy. The antibiotic activity was tested by determining the minimum inhibitory concentration in a *Mycobacterium tuberculosis* culture. The predicted molecular formulas from characterization results were: $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ for Co-PZA (1) complex and $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ for Co-PZA (2) complex. The two complexes showed a higher antimicrobial capacity than pyrazinamide.

Key words: cobalt, pyrazinamide, tuberculosis.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis*, altamente contagiosa y transmitida de persona a persona por vía aérea a través de gotas expelidas desde la garganta y pulmones de personas con tuberculosis activas¹. Un creciente número de personas contraen tuberculosis, afectando cada año a 10 millones de personas y matando a 1,5 millones de ellas. El curso de la enfermedad se ve comprometido, en pacientes con sistemas inmunes comprometidos, ya sea por fármacos inmunosupresores, sustancias en abuso, o SIDA/VIH, afectando especialmente a poblaciones en África y en países asiáticos como China, India o Indonesia². Por lo tanto, la tuberculosis es una de las principales causas actuales de muerte en el mundo.

Otro problema crítico asociado a la tuberculosis ha sido la resistencia a los fármacos, limitando la capacidad del control de la enfermedad, generando la aparición de tuberculosis multidrogo-resistente (TB-MDR) y tuberculosis extremadamente drogo-resistente (TB-XDR)³.

La pirazinamida (PZA) actúa como bactericida matando los bacilos tuberculosos semi-latentes a un pH ácido que no son destruidos por otras drogas antituberculosas. Se usa en esquemas de tratamiento de primera y segunda línea, y en particular en combinación con isoniazida, etambutol y rifampicina en diferentes formas de dosificación⁴. La aparición de cepas resistentes a PZA representa un problema importante en la salud pública a nivel mundial. Por tal razón, se tiene la necesidad de identificar nuevos agentes terapéuticos que permitan superar las limitaciones actuales de los esquemas de tratamiento frente a los casos de tuberculosis drogo-resistente.

Se han reportado numerosas investigaciones de complejos metálicos con diferentes fármacos utilizando como ion metálico a Cu(II), Zn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cd(II), resultando un aumento de la actividad biológica/antimicobiana y disminución en el desarrollo de la resistencia antibiótica^{4,5}. Por tal motivo los compuestos antituberculosos obtenidos a partir de la coordinación de un ligando con iones metálicos son potencialmente una mejora en la estrategia para el tratamiento de esta enfermedad.

Este trabajo ha planteado la síntesis de dos derivados de PZA que incluyen un centro metálico de cobalto (II), con la finalidad de obtener compuestos anti-tuberculosis con el potencial de actuar sobre cepas resistentes a PZA así como de reducir la generación de resistencia antibiótica. La caracterización de los complejos sintetizados es de fundamental importancia ya que no solo permiten el descubrimiento de la estructura molecular, sino también podrían favorecer el futuro descubrimiento de un mecanismo de acción probable.

Los complejos de cobalto exhiben un resultado prometedor inhibiendo el crecimiento de la bacteria en comparación con el fármaco libre (PZA) posiblemente debido a la presencia de los iones metálicos que alteran la estructura del fármaco mejorando aún más el rendimiento de su transporte, lo que es importante para aumentar la capacidad antituberculosa.

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$

Se disolvió 1,10 g (4,62 mmol) de cloruro de cobalto (II) hexahidratado (J.T. Baker) en 100 mL de metanol (Merck) en un balón de reacción. Posteriormente se agregó al mismo balón el ligando pirazinamida (Merck) 1,14 g (9,26 mmol), previamente disuelto en 100 mL de metanol. La síntesis se llevó a cabo en reflujo por aproximadamente dos horas en constante agitación, transcurrido el tiempo de reacción se filtró y se lavó el precipitado formado con metanol caliente.

Síntesis del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$

Se disolvió 1,51 g (5,19 mmol) de nitrato de cobalto (II) hexahidratado (Merck) en 150 mL de metanol (Merck) en un balón de reacción. Posteriormente, se agregó al mismo balón el ligando pirazinamida (Merck) 1,28 g (10,40 mmol), previamente disuelto en 100 mL de metanol. La síntesis se llevó a cabo en reflujo por aproximadamente dos horas en constante agitación, transcurrido el tiempo de reacción se filtró y se lavó el precipitado formado con metanol caliente.

Técnicas de caracterización de los complejos

Análisis elemental de C, H y N

Se determinó el porcentaje de carbono, hidrógeno y nitrógeno en cada complejo con el analizador Perkin-Elmer 2400 Series II de la Central Analítica del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo.

Espectroscopía de absorción atómica de cobalto

Se determinó el contenido de cobalto en cada complejo con el espectrofotómetro de absorción atómica Shimadzu AA-7000 de la Universidad Nacional de Ingeniería, utilizando una lámpara de cátodo hueco de cobalto a 240,7 nm. La curva de calibración se preparó en concentraciones de 0,4, 1,0 y 2,0 ppm de cobalto en ácido nítrico (Merck) 0,5 M y los complejos fueron disueltos en ácido nítrico 0,5 M para obtener una concentración aproximada de 1 ppm de cobalto.

Determinación de cloruros en el complejo [Co(PZA)₂Cl₂]

Se determinó el contenido de cloruros en el complejo por volumetría con el método argentométrico. Para ello, se preparó la muestra con 0,0455 g de complejo en un volumen final de 50 mL y se valoró la muestra por duplicado con nitrato de plata (Merck) 0,0481 N utilizando dicromato de potasio (Merck) como indicador.

Análisis termogravimétrico

Se realizó el análisis termogravimétrico de los complejos con el analizador TA Instruments TGA Q500 de la Central Analítica del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo, la temperatura máxima de alcance fue de 950 °C.

Susceptibilidad magnética

La determinación del momento magnético se realizó mediante la medición de las masas de los complejos en una balanza SHIMADZU AW120 del Laboratorio LAQISE-BIMET del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo con la aplicación de un campo magnético mediante un dispositivo elaborado en el mismo laboratorio. Este análisis se realizó midiendo por cuadruplicado la masa de los complejos antes y después de la aplicación de un campo magnético. Para la verificación de las mediciones se utilizó un patrón de tetra(tiocianato) cobaltato (II) de mercurio, Hg[Co(SCN)₄] que presenta un valor de $\chi = 16,44 \times 10^{-6}$ unidades CGS/Gauss a 20 °C midiendo su masa de la misma manera que los complejos.

Espectroscopía UV-Visible

Los espectros UV-Visible de los complejos y el ligando se obtuvieron con el espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 de la Universidad Nacional de Ingeniería, en el rango de 200 a 900 nm. Para la medición en el rango visible se prepararon soluciones de los complejos de 0,002 M en metanol (Merck). Mientras que, para la medición en el rango ultravioleta, las concentraciones fueron de 0,001M, aproximadamente.

Espectroscopía infrarroja FTIR

Los espectros de infrarrojo de los complejos y el ligando fueron obtenidos por lectura directa con el espectrofotómetro Perkin-Elmer de la Universidad Nacional de Ingeniería, con reflectancia total atenuada (ATR) desde 400 a 4000 cm⁻¹.

Espectroscopía Raman

Se obtuvieron los espectros de los complejos y el ligando con el espectrofotómetro Raman Horiba One Xplora de la Universidad Nacional de Ingeniería, utilizando un láser de 785 nm con una potencia de 50 mW desde 200 a 1800 cm⁻¹.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

La concentración mínima inhibitoria fue estimada cultivando tres cepas de *M. tuberculosis* (H37Rv, DM97 y D49N) en caldos de cultivo 7H9 enriquecidos con OADC (albumina oleica dextrosa catalasa) a pH 6 y 7 con diferentes concentraciones de pirazinamida y complejos⁶. La cepa H37Rv es una cepa de referencia sensible a pirazinamida; las cepas DM97 y D49N son cepas aisladas de muestras de pacientes resistentes a pirazinamida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de los complejos $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ y $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$

De la síntesis de los complejos $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ y $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ se obtuvieron dos sólidos no cristalinos de color lila (figura 1A) y color anaranjado (figura 1B), respectivamente. Los rendimientos de las reacciones fueron de 89 % y 55 %, respectivamente. Además, se determinó que ambos complejos se descomponen a temperaturas mayores a 240 y 260 °C, respectivamente. Ambos complejos son solubles en solventes polares que apolares, a excepción de la acetona, donde ambos complejos son insolubles.

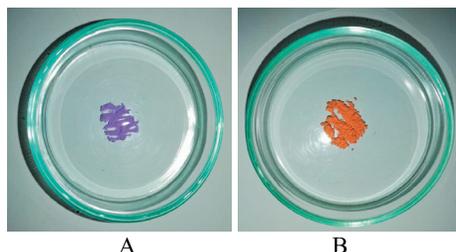


Figura 1. (A) Fotografía del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$. (B) Fotografía del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Composición química elemental de los complejos

Los resultados del análisis elemental (C, H y N), contenido de cobalto (Co) y cloruros se muestran a continuación en la tabla 1, junto a los valores calculados de acuerdo con las fórmulas moleculares propuestas.

Tabla 1. Resultados de la composición elemental de los complejos.

Elemento	$[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$		$[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$	
	% Experimental	% Calculado	% Experimental	% Calculado
C	32,39	31,94	26,01	26,86
H	2,97	2,68	2,87	2,0
N	22,82	22,35	24,65	25,06
Co	15,62	15,67	13,13	13,18
Cl	18,74	18,85	No aplica	No aplica

Análisis termogravimétrico

El complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ se descompone en tres etapas, la pérdida total de estas tres etapas fue de 79,58, dejando como residuo el 20,42 % de la masa inicial analizada, el cual es asignado al óxido metálico formado al final del proceso^{5,7}. De la misma manera, el complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ se descompone en 4 etapas, formando un óxido de cobalto^{5,7} al final del proceso, el cual es asignado al residuo final de 17,46 %. En la tabla 2 se muestran los porcentajes experimental y calculado del óxido de cobalto formado (CoO) al final de la descomposición térmica de cada complejo. Las diferencias entre los porcentajes experimentales y calculados, puede deberse a la pureza de los complejos⁵.

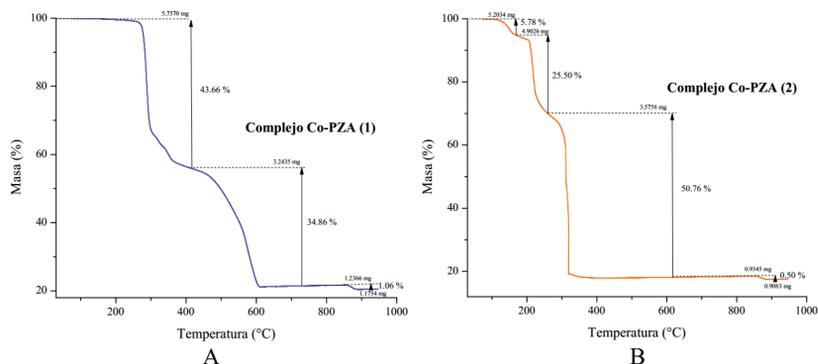


Figura 2. Curvas termogravimétricas de (A) El complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ (B) El complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Tabla 2. Resultados del porcentaje de óxido de cobalto formado (CoO).

Complejo	% Experimental	% Calculado
$[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$	20,42	19,93
$[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$	17,46	16,76

Susceptibilidad magnética

Los valores del momento magnético efectivo (μ_{eff}) obtenido experimentalmente para los complejos $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ y $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ fueron de 4,668 y 4,473, respectivamente. Estos valores se obtuvieron de las medidas de susceptibilidad magnética molar corregidas con las contribuciones diamagnéticas de los iones y ligandos presentes en los complejos. Las contribuciones diamagnéticas se estimaron usando las constantes de Pascal^{8,9} mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados del porcentaje de óxido de cobalto formado (CoO).

Iones / elemento / molécula	Contribución diamagnética ($\times 10^{-6}$ unidades CGS)
Co ²⁺	-12
C	-6
H	-2.93
O	-1.73
N	-4.61
Cl	-23
NO ₃ ⁻	-19
H ₂ O	-14

Con base en los valores del momento magnético efectivo obtenidos de los complejos y de acuerdo con la tabla 4, se comprueba que ambos valores corresponden al ion metálico de Co^{2+} con tres electrones desapareados en un entorno octaédrico^{8,10}, es decir, un campo octaédrico débil o de espín alto con configuración $t_{2g}^5 e_g^2$ y EECC (energía de estabilización de campo cristalino) igual a $0.8\Delta_o^8$.

Tabla 4. Momento magnético para algunos iones de metales de transición¹⁷.

Iones	μ_{eff} teórico o calculado	μ_{eff} experimental
V^{4+}	1,73	1,7 – 1,8
Cu^{2+}	1,73	1,7 – 2,2
V^{3+}	2,83	2,6 – 2,8
Ni^{2+}	2,83	2,8 – 4,0
Cr^{3+}	3,87	~ 3,8
Co^{2+}	3,87	4,1 – 5,2
Fe^{2+}	4,90	5,1 – 5,5
Co^{3+}	4,90	~ 5,4
Mn^{2+}	5,92	~ 5,9
Fe^{3+}	5,92	~ 5,9

Espectroscopía UV- Visible

El diagrama de Orgel para el ion Co^{2+} en campos octaédricos débiles revela que se debe observar un espectro con tres absorciones⁸. Transiciones desde el estado basal: ${}^4T_{1g}(\text{F})$, a ${}^4T_{2g}(\text{F})$, ${}^4A_{2g}(\text{F})$ y ${}^4T_{1g}(\text{P})$ provocan absorciones de banda ancha en la región del visible y el infrarrojo cercano. La primera banda, asignada a la transición ${}^4T_{1g}(\text{F}) \leftrightarrow {}^4T_{2g}(\text{F})$, es usualmente encontrada en la región de $5500 - 11000 \text{ cm}^{-1}$. La segunda banda es débil (pero permitida por el spin), asignada a la transición ${}^4T_{1g}(\text{F}) \leftrightarrow {}^4A_{2g}(\text{F})$ es encontrada en la región de $12000 - 17000 \text{ cm}^{-1}$; la tercera banda es asignada a la transición ${}^4T_{1g}(\text{F}) \leftrightarrow {}^4T_{1g}(\text{P})$, 2P , 2G y usualmente es encontrada en la región de $16000 - 22000 \text{ cm}^{-1}$ ¹¹. Los espectros UV-Visible de los complejos muestran dos bandas para cada complejo, a 320 nm (31250 cm^{-1}) y 522 nm (19157 cm^{-1}) para el complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$; y a 319 nm (31347 cm^{-1}) y 513 nm (19493 cm^{-1}) para el complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$. Las bandas a 320 y 319 nm (ultravioleta) de los complejos se atribuyen a la presencia del ligando debido a las transiciones electrónicas de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ ¹² y las bandas a 522 y 513 nm (visible) a la presencia del metal de transición. Estas dos últimas, son bandas de baja absorbancia opacadas por la intensidad de las bandas en la región del ultravioleta, y son asignadas a la transición ${}^4T_{1g}(\text{F}) \leftrightarrow {}^4T_{1g}(\text{P})$; debido a que las transiciones ${}^4T_{1g}(\text{F}) \leftrightarrow {}^4T_{2g}(\text{F})$ y ${}^4T_{1g}(\text{F}) \leftrightarrow {}^4A_{2g}(\text{F})$ ocurren a menor número de onda y no se observan en los espectros.

Espectroscopía infrarroja FTIR

Pirazinamida tiene cuatro átomos donadores: los nitrógenos del anillo pirazina, el oxígeno del grupo carbonilo y el nitrógeno del grupo amino, por lo tanto, tiene diferentes modos de enlace al ion metálico¹³, es decir diferentes sitios de coordinación (figura 3). En algunos complejos, la coordinación de la pirazinamida al metal ocurre a través de los nitrógenos del anillo¹² y otras veces a través del oxígeno de grupo carbonilo¹⁴.

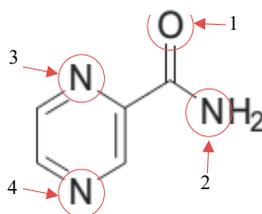


Figura 3. Molécula de pirazinamida y sus posibles modos de coordinación.

Al comparar los espectros de pirazinamida (figura 4) y el complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ (figura 5), se observa que hay cambios en los números de onda de los picos relacionados con el grupo funcional amida NH_2 y el anillo aromático. Los cambios más resaltantes se observan en los dos primeros picos de pirazinamida (3408 y 3148 cm^{-1}) que corresponden al NH_2 debido a la tensión asimétrica y simétrica de los enlaces N-H^{15} , además también se observa que el pico de 1608 cm^{-1} que corresponde a la flexión de los enlaces N-H sufre un desplazamiento a 1591 cm^{-1} en el complejo. Así también, se observan desplazamientos y cambios morfológicos en los picos a 618 , 511 y 428 cm^{-1} de pirazinamida hacia 639 , 531 y 451 cm^{-1} en el complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ que corresponden a vibración de torsión, balanceo y flexión fuera del plano del grupo amida¹⁶. Todos estos cambios observados en el rango de 3500 - 3100 , 1600 y de 600 - 400 cm^{-1} , aproximadamente evidencian la formación de un enlace a través del nitrógeno del grupo amida con el centro metálico de cobalto. Por otro lado, también se observan desplazamientos en los picos que han sido asignados al anillo aromático¹⁶ y se observa además la aparición o intensificación en el espectro del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ de una vibración a 949 cm^{-1} que no está activa en el espectro de pirazinamida. De acuerdo con la bibliografía revisada este pico puede corresponder a una vibración del anillo aromático¹⁷ que tiene sustituciones en las posiciones 1,2 y 4 (del anillo), es decir, un anillo bencénico 1, 2 y 4 – trisustituido¹⁵ que además tiene otra vibración a 780 cm^{-1} y que se expresa a 785 y 793 cm^{-1} en pirazinamida y el complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$, respectivamente. Por lo tanto, un enlace a través del nitrógeno en la posición 4 del anillo (tomando como posición 2 la sustitución debido al grupo amida) y el centro metálico de cobalto podría tomar lugar.

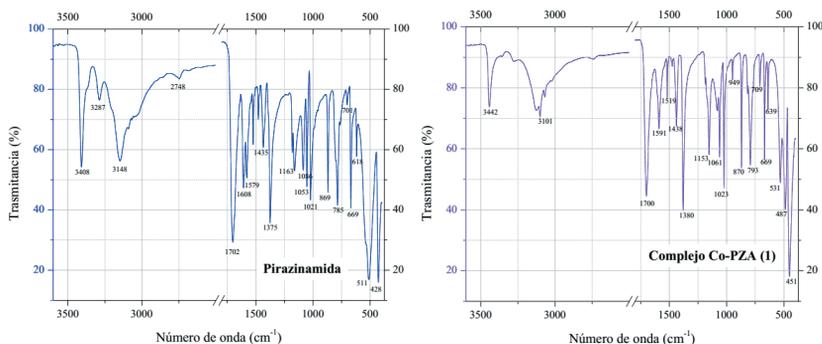


Figura 3. Espectro IR de pirazinamida. Figura 5. Espectro IR de $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$.

Para el complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (figura 6), se observa que hay cambios en los números de onda y morfología de los picos relacionados con el grupo funcional amida NH_2 y carbonilo $\text{C}=\text{O}$. Si empezamos el análisis por las bandas a mayor número de onda encontramos que los picos a 3369 y 3086 cm^{-1} del complejo, corresponden a los desplazamientos de los picos a 3408 y 3148 cm^{-1} de pirazinamida, vibraciones que se deben a la tensión simétrica y asimétrica del enlace N-H^{15} . También se observa que el pico a 3287 cm^{-1} de pirazinamida debido a la tensión simétrica del enlace N-H^{16} , no aparece en el espectro del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$. Además, el pico a 1608 cm^{-1} que corresponde a la flexión de los enlaces N-H^{16} sufre un desplazamiento a 1624 cm^{-1} , así como la vibración a 1086 cm^{-1} por balanceo del grupo amida NH_2 se desplaza a 1098 cm^{-1} . Todos estos cambios mencionados anteriormente reflejan la formación de un enlace a través del nitrógeno del grupo amida y el centro metálico de cobalto del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$. Otra variación importante entre los espectros es la banda a 1683 cm^{-1} del complejo Co-PZA (2) proveniente del desplazamiento del pico a 1702 cm^{-1} de pirazinamida. El rango general para verificar la presencia de vibraciones debido al grupo funcional $\text{C}=\text{O}$ es de $1850\text{--}1550 \text{ cm}^{-1}$ debido a la tensión entre el carbono y el oxígeno de la molécula¹⁵, siendo esta su banda característica. Por lo tanto, se asigna al pico de 1702 cm^{-1} la vibración del enlace $\text{C}=\text{O}^{16}$ en pirazinamida y al pico de 1683 cm^{-1} del complejo. Al verificar un desplazamiento en el espectro del complejo para la vibración más representativa de este grupo, se puede afirmar que a través del oxígeno se estaría dando lugar a un enlace con el centro metálico del complejo. Otras zonas importantes en el espectro del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ que no provienen de las vibraciones causadas por los grupos funcionales del ligando pirazinamida evidencian variaciones. La primera de ellas se da en la región de $1500\text{--}1250 \text{ cm}^{-1}$ donde se observan bandas a 1406 , 1386 , 1309 y 1296 cm^{-1} . En esta zona ya existen vibraciones provenientes de pirazinamida, sin embargo, de acuerdo con la literatura, también en esta zona se expresan vibraciones debido al enlace M-ONO_2^- ^{18,19}, la bibliografía indica que cuando se forma un enlace covalente M-O-NO_2^- se origina un desdoblamiento de dos bandas presentes en el espectro del ion nitrato, el primer desdoblamiento ocurre con una banda aproximadamente a 1390 cm^{-1} la cual genera bandas a 1300 y 1500 cm^{-1} aproximadamente^{18,19}. El desdoblamiento de la banda del ion nitrato al formarse el enlace M-O-NO_2^- ocurre a 1406 y $1309\text{--}1296 \text{ cm}^{-1}$ en el espectro del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$. El segundo desdoblamiento ocurre con una banda a 720 cm^{-1} (perteneciente al ion nitrato) la cual genera bandas débiles que muchas veces pasan desapercibidas en el espectro infrarrojo¹⁸. En el espectro del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ existen bandas a 714 y 702 cm^{-1} las cuales son consideradas señales producto del desdoblamiento de la banda 720 cm^{-1} ^{18,19} del ion nitrato. Por lo tanto, de acuerdo con las variaciones observadas, se deduce que la coordinación del ligando pirazinamida hacia el átomo metálico de cobalto sucede a través del nitrógeno y oxígeno del grupo amida, ocupando cuatro sitios de coordinación en total por las dos moléculas de pirazinamida presentes en el complejo. Además, también se evidencia la formación de un enlace covalente a través del oxígeno del grupo nitrato de forma monodentada.

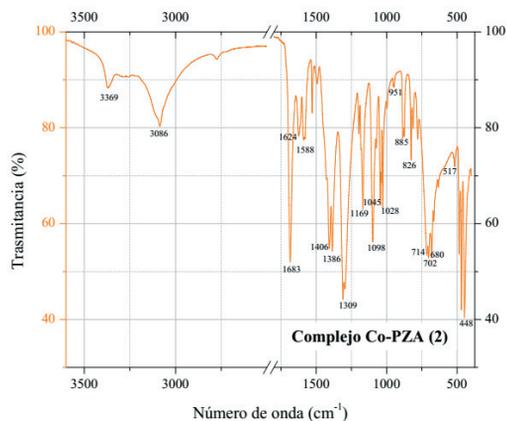


Figura 6. Espectro IR de $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Espectroscopía Raman

Se analizaron las variaciones en los números de onda de los picos más importantes del espectro de pirazinamida (figura 7) y de los complejos. Se observa dos picos en el espectro del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ (figura 8) que no aparecen en el espectro de pirazinamida, el primero a 225 cm^{-1} y el segundo a 454 cm^{-1} , de acuerdo con la bibliografía revisada para este estudio se ha encontrado que alrededor de 200 y 400 cm^{-1} son frecuentes las vibraciones del enlace M-Cl¹⁷. Por ejemplo, a 430 cm^{-1} se observa una banda para el compuesto de CoCl_2 , además a 320 y 230 cm^{-1} se observan bandas para los compuestos de $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{py}$ y $\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{py}$, respectivamente (donde py representa a piridina)¹⁵. Por otro lado, J. E. Rüede y D. A. Thornton²⁰ afirman que para un compuesto octaédrico de cobalto del tipo ML_2X_2 donde L es piridina y X es cloro, existen dos vibraciones en el infrarrojo correspondientes al enlace Co-Cl los cuales aparecen a 222 y 230 cm^{-1} . Mientras que para un compuesto de tipo tetraédrico las vibraciones para el mismo enlace aparecen a 307 y 346 cm^{-1} ²⁰. Por lo tanto, con la evidencia de los rangos a los que aparecen las vibraciones de un enlace tipo M-X (donde M es el metal y X es el halógeno) tanto en el espectro infrarrojo como en el Raman, en este estudio se ha asignado al enlace Co-Cl los picos de 225 y 454 cm^{-1} del complejo. También se observan diferencias importantes en los números de onda que corresponden a los enlaces C-C, C-H, C-N del anillo aromático. Por ejemplo, el pico a 779 cm^{-1} en pirazinamida se presenta como una señal de baja intensidad a 765 cm^{-1} en el complejo, esta vibración es asignada al enlace C-N del anillo¹⁶. Otro cambio que se observa en cuanto a las vibraciones generadas por el anillo aromático es el alejamiento entre los picos a 1168 y 1182 cm^{-1} de pirazinamida que en el complejo aparecen a 1160 y 1188 cm^{-1} duplicando su separación. Por las diferencias observadas entre los espectros que corresponden a pirazinamida y el complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$, en este estudio se concluye que existen enlaces entre el centro metálico de cobalto y el cloro (Co-Cl) y además con un nitrógeno del grupo amida y del anillo aromático (Co-N).

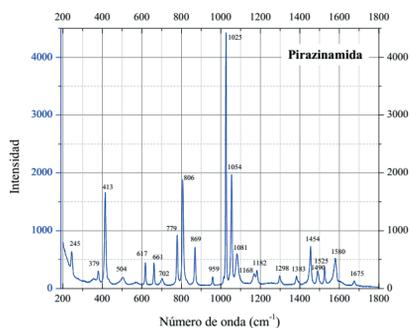


Figura 7. Espectro Raman de pirazinamida.

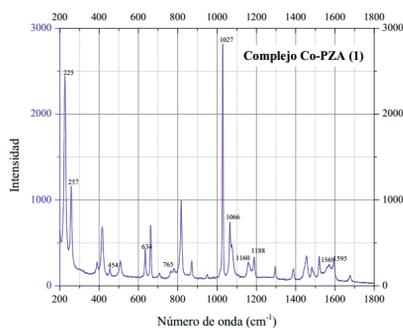


Figura 8. Espectro Raman de $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$.

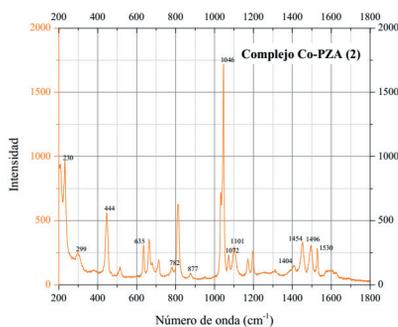
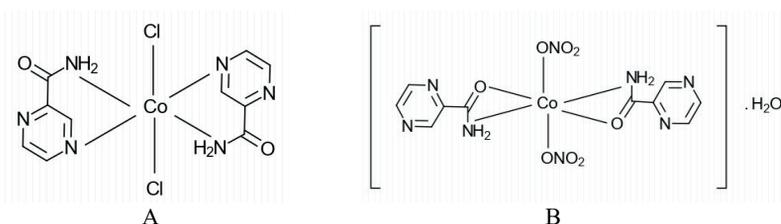


Figura 9. Espectro Raman del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Al comparar los espectros de pirazinamida y el complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (figura 9), se observa que los cambios más significativos ocurren con las absorciones relacionadas al grupo amida como los desplazamientos de las señales de pirazinamida a 413, 617 y 1081 cm^{-1} ¹⁸ hacia 444, 635 y 1101 cm^{-1} en el complejo. Otro cambio importante se observa en el pico a 1675

cm⁻¹ de pirazinamida, este pico es característico del grupo C=O¹⁶ y se observa el cambio de su señal en el espectro del complejo [Co(PZA)₂(NO₃)₂].H₂O. De esta manera, se evidencia la formación de un enlace entre el cobalto y el oxígeno del grupo C=O. Por lo tanto, luego de analizar los cambios importantes entre los espectros de pirazinamida y el complejo, se concluye que los enlaces entre el centro metálico de cobalto y la molécula de pirazinamida suceden a través del nitrógeno del grupo amida y del oxígeno del mismo grupo.

Finalmente, en las figuras 10 (A y B) se muestran las estructuras propuestas basadas en la caracterización realizada.



Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Los resultados de la determinación de la MIC de pirazinamida y los complejos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la concentración mínima inhibitoria de pirazinamida y los complejos.

Droga	pH 6			pH 7		
	H37Rv	DM97	D49N	H37Rv	DM97	D49N
Pirazinamida	0,81 mM	> 6,5 mM				
[Co(PZA) ₂ Cl ₂]	0,04 mM	0,33 mM	0,02 mM	0,33 mM	0,33 mM	0,02 mM
[Co(PZA) ₂ (NO ₃) ₂]	0,03 mM	0,28 mM	0,02 mM	0,28 mM	0,28 mM	0,02 mM

La estimación cuantitativa de la MIC fue determinada usando el método de ensayo en microplaca con tetrazolium (TEMA), donde la capacidad de oxidación-reducción del colorante tetrazolium permitió los cambios colorimétricos con los que fue posible realizar la cuantificación de la MIC⁶. La tabla 5 muestra que los complejos inhiben el crecimiento de las cepas de *M. tuberculosis* sensible (H37Rv) y resistentes a pirazinamida (DM97 y D49N) tanto a pH 6 como a pH 7 en menor concentración que el fármaco libre pirazinamida, es decir, que en el ensayo en microplaca los complejos demostraron poseer mayor capacidad antimicrobiana que el fármaco libre pirazinamida, siendo el complejo [Co(PZA)₂Cl₂] el de mayor actividad contra *M. tuberculosis in vitro*.

CONCLUSIONES

Las fórmulas moleculares propuestas con base en los resultados de la caracterización para los complejos fueron $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ para el complejo Co-PZA (1) y $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ para el complejo Co-PZA (2), en ambos complejos el centro metálico de cobalto se encuentra en un entorno octaédrico donde las moléculas de pirazinamida se ubican en el plano horizontal y los ligandos cloro y nitrato en el plano axial de la molécula. La determinación de la concentración mínima inhibitoria analizada para los complejos y el fármaco libre pirazinamida en cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* en las cepas sensible (H37Rv) y resistentes a pirazinamida (DM97 y D49N) mostró que los complejos tienen mayor capacidad antimicrobiana que el fármaco libre (pirazinamida), siendo el complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ el de mayor actividad contra *M. tuberculosis*.

AGRADECIMIENTO

Se hace un agradecimiento especial al Laboratorio de LAQISE-BIMET del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo, a la Central Analítica del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo y al Laboratorio de Electroquímica Aplicada (GIEA) de la Universidad Nacional de Ingeniería, por contribuir con la realización de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bouz G, Semelková L, Jand'ourek O, Konečná K, Paterová P, Navrátilová L, *et al.* Derivatives of 3-Aminopyrazine-2-carboxamides: Synthesis, antimicrobial evaluation, and *in vitro* cytotoxicity. *Molecules*. 2019; 24(7):1212. doi: 10.3390/molecules24071212.
2. OMS. Informe Mundial sobre la Tuberculosis. [Internet] 2019. [Citado 12 mayo 2020]. Disponible en: https://www.who.int/tb/publications/global_report/es/
3. Reddyrajula R, Dalimba U. The bioisosteric modification of pyrazinamide derivatives led to potent antitubercular agents: Synthesis via click approach and molecular docking of pyrazine-1,2,3-triazoles. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2020; 30(2):126-146.
4. Ali M, Ul Qader SA, Shahid F, Arayne MS, Mumtaz M. Synthesis, characterization and enzyme inhibitory activity of new pyrazinamide iron complexes. *Pak J Pharm Sci*. 2017; 30(3): 825–31.
5. Ali AE, Elsalas GS, Mohamed EA, Kolkaila SA. Spectral, thermal studies and biological activity of pyrazinamide complexes. *Heliyon*. 2019; 5(11):e02912. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02912
6. Caviedes L, Delgado J, Gilman H. Tetrazolium Microplate Assay as a Rapid and Inexpensive Colorimetric Method for Determination of Antibiotic Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2002 May;40(5): 1873-1874.
7. Gabbott P. Principles and Applications of Thermal Analysis. First edition. Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing; 2007.
8. Huheey JE, Keiter EA, Keiter RL. Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity. 4th Edition. New York: Harper Collins; 1993.

9. Bain GA, Berry JF. Diamagnetic Corrections and Pascal's Constants. *J Chem Educ.* 2008; 85(4):532-536.
10. Netalkar PP, Netalkar SP, Budagumpi S, Revankar VK. Synthesis, crystal structures and characterization of late first row transition metal complexes derived from benzothiazole core: anti-tuberculosis activity and special emphasis on DNA binding and cleavage property. *Eur J Med Chem.* 2014;79: 47-56.
11. Reedijk J, Driessen WL, Groeneveld WL. A semi-empirical energy-level diagram for octahedral cobalt(II) complexes. *Recl Trav Chim Pays-Bas.* 2010; 88(9): 1095-1109.
12. Chiniforoshan H, Radani ZS, Tabrizi L, Tavakol H, Sabzalian MR, Mohammadnezhad G, *et al.* Pyrazinamide drug interacting with Co(III) and Zn(II) metal ions based on 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline ligands: Synthesis, studies and crystal structure, DFT calculations and antibacterial assays. *J Mol Struct.* 2015; 1081: 237-243.
13. Akyuz S, Andreeva L, Minceva-Sukarova B, Basar G. Vibrational spectroscopic study of two dimensional polymer compounds of pyrazinamide. *J Mol Struct.* 2007; 834-836: 399-402.
14. Shirvan SA, Haydari Dezfuli S. Catena-Poly[[[aqua(pyrazine-2-carboxamide- κ 2N1,O) zinc]- μ -pyrazine-2-carboxamide- κ 3N1,O:N4] dinitrate]. *Acta Crystallogr Sect E-Struct Rep Online.* 2012; 68(5): 627-628.
15. Socrates G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies.* Hoboken, New Jersey: Wiley; 2004.
16. Chiş V, Pîrnaşu A, Jurcaş T, Vasilescu M, Simon S, Cozar O, *et al.* Experimental and DFT study of pyrazinamide. *Chem Phys.* 2005; 316(1-3): 153-163.
17. Alves OL, Hase Y. The Infrared Spectra of Cobalt(II) Halide Complexes with Trimethylphosphine Oxide (TMPO). *Spectrosc Lett.* 1982; 15(6): 423-433.
18. Moeller T. *Inorganic Syntheses.* Volume V. First edition. New York: Mcgraw-Hill Inc; 1957.
19. Curtis NF, Curtis YM. Some Nitrate-Amine Nickel(II) Compounds with Monodentate and Bidentate Nitrate Ions. *Inorg Chem.* 1965; 4(6): 804-809.
20. Rüede JE, Thorton DA. The far infrared spectra of metal chloride complexes of pyridine in relation to their structures. *J Mol Struct.* 1976; 34(1): 75-81.

VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Ophryosporus peruvianus*

Edith María Fernanda Mattos Vila, Ingrit Elida Collantes Díaz*

RESUMEN

El arbusto efímero *Ophryosporus peruvianus* fue recolectado por cinco meses (diciembre 2018 hasta abril 2019) en Andahuaylillas (Cusco). El aceite esencial de las hojas del arbusto fue obtenido por hidrodestilación y analizado por cromatografía gaseosa acoplado a espectrómetro de masas. Fueron identificados 89 componentes del aceite esencial entre monoterpenos oxigenados, hidrocarburos sesquiterpénicos, sesquiterpenos oxigenados, diterpenos oxigenados, entre otros, de los cuales los componentes mayoritarios fueron los hidrocarburos sesquiterpénicos β -cariofileno, (Z)- β -farneseno y β -sesquifelandreno y estuvieron presentes en las muestras de los 5 meses de colecta.

Palabras clave: aceite esencial, variación estacional, sesquiterpenos

SEASONAL VARIATION OF THE CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE ESSENTIAL OIL OF THE LEAVES FROM *Ophryosporus peruvianus*

ABSTRACT

The ephemeral shrub *Ophryosporus peruvianus* was collected for five months (December 2018 – April 2019) in Andahuaylillas (Cusco). The oil essential from leaves of the bush was obtained by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer. Eighty nine components of the essential oil were identified among oxygenated monoterpenes, sesquiterpenes hydrocarbons, sesquiterpenes oxygenated, oxygenated diterpenes, among others, of which the major components were the sesquiterpenes hydrocarbons β -caryophyllene, (Z)- β -Farnesene y β -Sesquiphellandrene and were presents in the samples of the five months of collection.

Key words: essential oil, seasonal variation, sesquiterpenes

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos lipofílicos, que se caracterizan por ser de baja masa molar y volátiles, en general estos compuestos juegan un rol ecológico importante en las plantas como protección contra microorganismos y herbívoros, atrayentes de polinizadores y de comportamientos aleloquímicos¹. La biosíntesis, la composición y la producción de los aceites esenciales pueden ser afectadas por factores bióticos y abióticos ambientales. En el contexto de la composición química y producción del aceite esencial, pueden ser diferentes entre los órganos de la misma planta y entre las diferentes fases estacionales (primavera, otoño, invierno y verano) del desarrollo de la planta^{2,3}. Más de 1000 compuestos orgánicos volátiles ya fueron identificados y consisten de aldehídos, alcoholes, ésteres y varios tipos terpenos².

Ophryosporus peruvianus es un arbusto que puede ser encontrado entre los meses de diciembre a abril, es por esa razón que es denominada una planta efímera⁴, esta especie pertenece al género *Ophryosporus* de la familia Asteraceae, familia que cuenta con aproximadamente 950 géneros y 20000 especies⁵. El género *Ophryosporus* presenta alrededor de 48 especies en el mundo y en el Perú se han registrado 21 especies⁶.

La especie *O. peruvianus* puede ser localizada en las regiones de la sierra del Perú, dependiendo de su localización recibe varios nombres populares y es usada en medicina popular para diferentes males dependiendo de su origen local^{7,8}. Del aceite esencial de las partes aéreas fue aislado e identificado epoxicariofileno del aceite esencial⁷ y de las partes aéreas fueron aislados e identificados 3-[3,3-dimetilalil]-5-senecioil-*p*-hidroxi-acetofenona; 6-acetil-8-isovaleril-2,2-dimetil-cromano y 3-isovateril-5-[1-hidroxi-3,3-dimetilalil]-*p*-hidroxiacetofenona⁹

El presente trabajo es un primer reporte de la variación estacional de la composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Ophryosporus peruvianus* colectados en el distrito de Andahuaylillas (Cusco) entre los meses de diciembre del 2018 hasta abril de 2019.

PARTE EXPERIMENTAL

Colecta del material vegetal

Las partes aéreas de *O. peruvianus* fueron colectadas en el distrito de Andahuaylillas, provincia de Quispicanchi departamento del Cusco a una altura de 3152 msnm. La colecta fue realizada mes a mes desde diciembre del 2018 hasta abril del 2019. El material vegetal para la identificación botánica fue colectado en el mes de febrero del 2019, mes en que la planta tenía las flores presentes. La identificación botánica fue realizada por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos según el Sistema de Clasificación de Croquist (1988) y fue clasificada que pertenece a la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, subclase Asteridae, orden Asterales, familia Asteraceae, género *Ophryosporus*, especie *Ophryosporus peruvianus* (J.F.Gmel) R. King & H. Rob. La especie

es conocida con los nombres populares arenilla, puschca, chichipia, té inka, cushpishkai, chichi casha, chichis, japia-japia, kulpishka y puede ser localizada en Canta, Huarochirí, Yauyos, Cusco, región Ancash en el distrito de Pamparomás y Cajatambo en las localidades de Cruzjirca, La Florida, Anthay y Astobamba.

La masa de hojas colectadas en diciembre del 2018 fue de 215,22 g, en enero, febrero, marzo y abril del 2019 fue de 330 g, 260 g, 991 g y 974 g, respectivamente.

Extracción de los aceites esenciales

Las hojas fueron separadas de los tallos y los aceites esenciales fueron obtenidos por hidrodestilación de 4 horas con aparato tipo Clevenger (Farmacopea), el aceite esencial fue extraído con éter de petróleo (EP) y secado con sulfato de sodio anhidro, el EP fue evaporado a temperatura de ambiente y el aceite fue pesado para determinar su rendimiento y guardado en congeladora (-20°C) hasta su análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)².

Análisis de los aceites esenciales

Las muestras del aceite esencial fueron preparadas a una concentración de 1mg/mL. 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 260 °C, temperatura del detector 280 °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 μL. La identificación de la composición química fue basada por 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 espectros¹⁰.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La hidrodestilación de las hojas de *O. peruvianus* produjo aceites esenciales de color amarillo transparente con presencia de cristales amarillos, los rendimientos fluctuaron como se puede apreciar en la tabla 1. De los meses de marzo y abril se obtuvo menores rendimientos debido a que la planta estaba más húmeda con respecto a los otros meses.

El análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas de los aceites esenciales permitió la identificación de 89 compuestos. Los componentes mayoritarios son β-Cariofileno, (Z)-β-Farneseno, (E)-β-Farnesene, aromadendrano, γ-Curcumeno, Germacreno D, biciclogermacreno, β-Sesquifelandreno, tran-Sesquisabineno hidrato, óxido de Cariofileno, β-Bisabolol, 11Hα-Himachal-4-en-1β-ol, α-Vetivono, enecalina y 2',3',3'-trimetil-2',3'-Dihidroangelicina, de los cuales se destacan β-cariofileno, (Z)-β-farneseno y β-sesquifelandreno (tabla 1). Analizando la composición química se puede observar la presencia de monoterpenos oxigenados (1-8, 11-13, 16 y 18), ésteres alifáticos

(9,10 y 14), alilbencenos (17, 23), hidrocarburos sesquiterpénicos (15, 19-22, 24-32, 34-42 y 45-46), cromenos (33, 61, 76 y 77), sesquiterpenos oxigenados (43-44, 47-60, 62-67, 69, 70, 72-75, 78 y 80), aldehído alifáticos (68), los diterpenos oxigenados (79, 81-83 y 85-86) y los alcanos (84, 87-89) (figura 1). Al analizar el total de los componentes químicos identificados (tabla 1) se observa que los hidrocarburos sesquiterpénicos son los que están presentes en mayor proporción, seguida de los sesquiterpenos oxigenados y cromenos, los demás compuestos están en baja proporción.

El último mes de colecta (abril 2019) presenta 11 compuestos que no están presentes en los meses anteriores (tabla 1) que son los monoterpenos oxigenados (1-5), hexil isovalerato (10), sesquicineole (43), acetato de occidol (80), acetato de cis-ferruginol (85), 6-dioxi-Taxodione (86) y pentacosano (87), todos ellos en bajo porcentaje. Este hecho coincide con el último mes en que es posible encontrar *O. peruvianus* ya que es una planta efímera⁴.

Tabla 5. Porcentajes de rendimiento de los aceites esenciales, así como, los componentes identificados, tiempo de retención y el porcentaje en el aceite esencial de las hojas de *O. peruvianus*.

		Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	
Porcentaje de rendimiento (%)		0,53	0,4	0,43	0,15	0,28	
Nombre	TR						
1	Alcohol de yomogi	4,428	0	0	0	0,02	
2	Linalool	7,114	0	0	0	0,05	
3	trans-Sabineno hidratado	7,490	0	0	0	0,08	
4	cis- <i>p</i> -Ment-2-en-1-ol	7,685	0	0	0	0,05	
5	trans- <i>p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	7,935	0	0	0	0,09	
6	cis- α -Necrodol	8,610	0	0,06	0	0,07	
7	Terpinen-4-ol	9,039	0,09	0,34	0,06	0,14	0,33
8	α -Terpineol	9,338	0,03	0,08	0	0,04	0,07
9	(3 <i>Z</i>)-Hexenil 3-metil butanoato	10,309	0,05	0,13	0,07	0,03	0,13
10	Hexil isovalerato	10,424	0	0	0	0	0,02
11	Acetato de cis-Crisantenil	10,569	0	0,1	0	0,05	0,09
12	Acetato de Bornilo	11,369	0	0	0	0,03	0,09
13	Acetato de Lavandulil	11,428	0,04	0,25	0	0,1	0,14
14	(3 <i>Z</i>)-Hexenil tigolato	12,087	0,07	0,08	0,11	0,04	0,05
15	δ -Elemeno	12,371	0,04	0	0	0,04	0,07
16	Acetato de α -Terpinil	12,624	0	0,04	0	0	0,02
17	Eugenol	12,716	0,19	0,06	0,32	0,15	0,58
18	Acetato de Neril	12,815	0,27	0,53	0,18	0,49	0,29
19	α -Ylangeno	13,112	0,15	0,23	0,13	0,09	0,17
20	β -Bourboneno	13,267	0,03	0,19	0,13	0,04	0,09
21	α -Duprezianeno	13,320	0,14	0,18	0	0,11	0,17
22	β -Elemeno	13,375	0,26	0,31	0,1	0,22	0,12
23	Metil eugenol	13,540	0,22	0,33	0,26	0,23	0,44
24	Italiceno	13,606	0,38	0,43	0,28	0,2	0,28
25	Sesquitujeno	13,772	0,04	0,04	0	0,03	0,06
26	β-Cariofileno	13,900	14,85	12,45	14,33	15,22	15,53
27	β -Ylangeno	14,030	0	0,04	0	0	0
28	trans- α -Bergamoteno	14,119	0,17	0,19	0,14	0,16	0,22
29	(<i>Z</i>)-β-Farneseno	14,252	14,94	16,99	17,36	13,61	14,22
30	α -Himacaleno	14,322	0,05	0,1	0	0,1	0,11

31	(E)-β-Farneseno	14,430	1,32	1,28	0,91	1,12	0,94
32	Aromadendrano	14,473	0,96	1,3	1,03	1,05	1,07
33	6-dimetoxi-Ageratocromeno	14,561	0	0	0	0,03	0,08
34	α-Acoradieno	14,635	0,08	0,08	0	0,04	0,07
35	β-Acoradieno	14,680	0,08	0,11	0,05	0,07	0,09
36	γ-Curcumeno	14,845	5,32	1,49	4,72	4,23	4,04
37	Germacreno D	14,922	4,87	0	4,74	6,25	4,33
38	β-Selineno	15,017	0,18	0,15	0,11	0,16	0,2
39	α-Zingibereno	15,093	0,41	0,16	0,2	0,35	0,4
40	Biciclogermacreno	15,175	1,23	0,39	1,02	1,35	0,78
41	β-Bisaboleno	15,310	0,35	0,35	0,24	0,3	0,33
42	β-Curcumeno	15,359	0,33	0,16	0,29	0,29	0,41
43	Sesquicineol	15,410	0	0	0	0	0,04
44	10-epi-Italiceno éter	15,468	0,16	0,23	0,23	0,21	0,26
45	β-Sesquifellandreno	15,571	16,25	14,39	9,73	14,56	13,25
46	(E)-γ-Bisaboleno	15,690	0,03	0	0	0,06	0,09
47	Italiceno éter	15,771	0,35	0,46	0,53	0,45	0,45
48	cis-Sesquisabineno hidrato	15,865	0,63	0,76	0,79	0,63	0,69
49	(E)-Nerolidol	16,140	0,45	0,66	0,37	0,65	0,81
50	(3Z)-Hexenil benzoato	16,275	0,06	0,16	0	0,07	0,12
51	trans-Sesquisabineno hidrato	16,421	1,68	2,85	2,76	2,43	2,23
52	Oxido de Cariofileno	16,549	1,39	3,22	2,03	1,72	1,92
53	β-Copaen-4-α-ol	16,718	0,2	0,3	0,34	0,28	0,39
54	Helifoleno-12-al A	16,840	0,15	0,21	0,18	0,32	0,3
55	Carotol	16,927	0,58	1,19	0,73	0,72	0,97
56	Widrol	17,052	0,06	0	0,07	0,08	0,22
57	1-epi-Cubenol	17,176	0,46	0,52	0,34	0,54	0,65
58	α-Acorenol	17,237	0,42	0,89	0,46	0,37	0,53
59	β-Acorenol	17,282	0,26	0,34	0,27	0,26	0,37
60	Cariofila-4(12),8(13)-dien-5α-ol	17,329	0,28	0,54	0,46	0,35	0,46
61	Desmetoxiencalinalina	17,491	0,11	0	0,14	0	0,21
62	β-Eudesmol	17,532	0,55	0,77	0,4	1,17	0,62
63	β-Bisabolol	17,777	1	1,08	1,02	1,08	1,25
64	α-Bisabolol	17,946	0,51	0,57	0,51	0,58	0,06
65	11-αH-Himacal-4-en-1-β-ol	18,005	1,93	2,95	1,88	2,62	2,27
66	(Z)-Nuciferol	18,131	0,23	0,39	0,27	0,3	0,37
67	(Z)-γ-Curcumen-12-ol	18,239	0,22	0,44	0,21	0,2	0,31
68	Pentadecanal	18,303	0,25	0,21	0,33	0,09	0,27
69	Curcufenol	18,376	0,03	0,06	0,08	0,05	0,1
70	Xantorizol	18,848	0,17	0,14	0,07	0,19	0,11
71	Aristolona	19,109	0	0,1	0	0	0,11
72	Acetato de (Z)-α-trans-Bergamotol	19,418	0,04	0	0	0,03	0,07
73	β-Vetivono	19,555	0,05	0,09	0	0,03	0,12
74	α-Vetivono	20,325	3,67	1,54	5,24	2,78	2,13
75	(Z)-acetato de Lancelol	20,608	0,07	0,07	0	0,05	0,11
76	Encecalinalina	21,473	5,5	5,07	9,15	6,75	5,81
77	2',3',3'-trimetil-2',3'-Dihidroangelicina	21,956	1,24	1,58	1,71	2,07	1,88
78	(5E,9E)-Farnesilacetona	22,360	0,03	0	0	0	0,02
79	Fitol	23,327	0,37	0,51	0,25	0,31	0,4
80	Acetato de Occidol	23,772	0	0	0	0	0,03
81	Semperviol	23,992	0,08	0,09	0,13	0,1	0,09
82	Abieta-7,13-dien-3-one	24,530	0,07	0,05	0,1	0,11	0,08
83	6,7-dihidro-Ferruginol	24,991	0,08	0,07	0,07	0,07	0,06

84	Tetracosano	25,324	0,03	0	0	0	0,03
85	Acetato de cis-Ferruginol	25,540	0	0	0	0	0,04
86	6-dioxi-Taxodion	25,749	0	0	0	0	0,03
87	Pentacosano	27,348	0	0	0	0	0,02
88	Hexacosano	29,230	0,11	0,14	0,14	0,1	0,12
89	Heptacosano	31,093	0,1	0,2	0,18	0,13	0,36
Monoterpenos oxigenados (%)			0,43	1,4	0,24	0,85	1,39
Ésteres alifáticos (%)			0,12	0,21	0,18	0,07	0,2
Alilbencenos (%)			0,41	0,39	0,58	0,38	1,02
Hidrocarburos sesquiterpénicos (%)			62,46	51,01	55,51	59,65	57,04
Cromenos (%)			6,85	6,65	11	8,85	7,98
Sesquiterpenos oxigenados (%)			15,63	20,43	19,24	18,16	17,98
Aldehídos alifáticos (%)			0,25	0,21	0,33	0,09	0,27
Diterpenos oxigenados (%)			0,60	0,72	0,55	0,59	0,70
Alkanos (%)			0,24	0,34	0,32	0,23	0,53
Total de compuestos identificados (%)			86,99	81,46	87,95	88,87	87,22

TR: tiempo de retención, Dic: diciembre, Ene: enero, Feb: febrero, Mar: marzo, Abr: abril.

En los cinco meses de colectas realizadas, fue observado 15 compuestos mayoritarios y dentro de este grupo (figura 1), fue constante la presencia de tres sesquiterpenos β -cariofileno (12,45-15,53 %), (Z)- β -farneseno (13,61-17,36 %) y β -sesquifelandreno (9,73-16,25 %), el primer mes de la colecta fue observado que β -sesquifelandreno es el mayoritario (16,25 %), el segundo y tercer mes de colecta se observó (Z)- β -farneseno como el mayoritario y son los más altos porcentajes observados en la composición del aceite y el penúltimo y último mes de colecta fue el β -cariofileno el de mayor porcentaje. Los tres sesquiterpenos representa 46,04 % para el mes de diciembre, 43,83 % enero, 41,42 % febrero, 43,39 % marzo y 43 % abril.

De los doce restantes componentes mayoritarios se observó que la enecalina está presente en los 5 meses y en febrero está en mayor porcentaje (9,15 %), lo que no se puede decir del germacreno D, no está presente en el mes de enero. γ -curcumeno y α -vetivono, están presentes todos los meses de colecta, observando que en el mes de enero presentan los más bajos porcentajes (1,49 % y 1,54 %, respectivamente).

Para el trans-sesquisabineno hidrato y el óxido de cariofileno sus máximos valores de porcentaje de presencia fueron alcanzados en los meses de enero y febrero. Los máximos valores de 11- α H-Himacal-4-en-1- β -ol son alcanzados en el mes de enero y marzo, finalmente 2',3',3'-trimetil-2',3'-Dihidroangelicina alcanza sus máximos valores en los meses de febrero y marzo.

Montenegro (2001) trabajó con el aceite esencial de las partes aéreas de *O. peruvianus* colectados en Yauyos, en este trabajo fue aislado el óxido de cariofileno, dato con el que presume que fue el compuesto mayoritario; comparando el estudio del 2001 con el presente trabajo, se observa que el óxido de cariofileno no es uno de los tres mayoritarios sesquiterpenos. De acuerdo a la literatura^{2,3} la composición de los aceites esenciales se puede ver afectado por factores bióticos y abióticos del medio ambiente, la planta fue colectada

en diferentes lugares. La composición química puede variar de acuerdo a los órganos de la planta^{2,3}, Montenegro uso partes aéreas (hojas, ramas y flores), mientras que en el presente estudio se usaron sólo hojas.

En los estudios de aceite esencial de las partes aéreas de otras especies del mismo género, *O. heptanthus*¹¹, *O. pinifolius*¹² y en *O. piquerioides*¹³ presentaron monoterpenos no oxigenados y oxigenados como mayoritarios, lo que no sucede en la especie objetivo de nuestro estudio. De los tres sesquiterpenos mayoritarios presentes en *O. peruvianus*, sólo β -cariofileno también está presente en *O. pinifolius* y *O. piquerioides*, con la diferencia que no corresponde a los mayoritarios en esas especies.

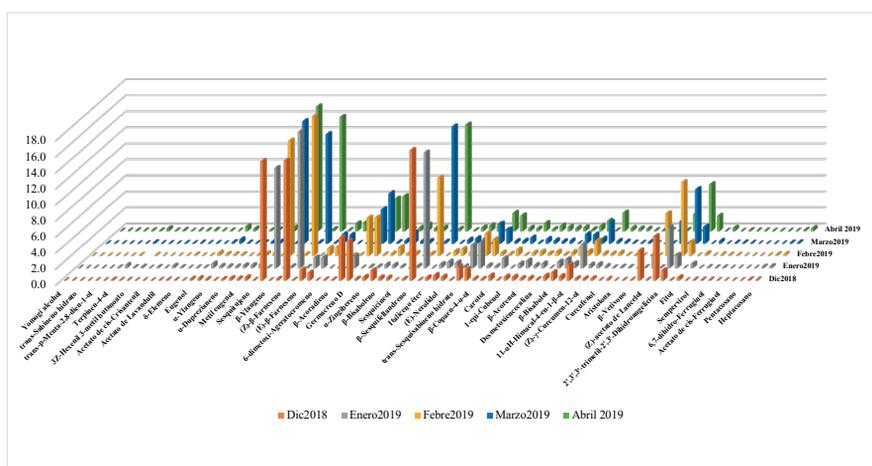


Figura 1. Variación estacional de la composición química del aceite esencial de las hojas de *O. peruvianus*.

El sesquiterpeno bicíclico natural β -cariofileno es comúnmente encontrado en los aceites esenciales de plantas como *Cinnamomum tamala* (25,3%), *Didymocarpus tomentosa* (78,7%), tiene actividad antioxidante, antibacteriano, anticancerígeno, antiinflamatorio, cardioprotector, hepatoprotector, gastroprotectivo, nefroprotectivo¹⁴.

(Z)- β -farneseno es un hidrocarburo sesquiterpénico acíclico con actividad insecticida y es atóxico para plantas, animales superiores y el hombre. También fue reportado su actividad antioxidante¹⁵.

β -sesquifelandreno es un sesquiterpeno que presenta actividad anticancerígena¹⁶.

La biosíntesis de los sesquiterpenos β -cariofileno, (Z)- β -farneseno y β -sesquifelandreno se llevan a cabo en el citosol a través de la vía del mevalonato¹⁴.

CONCLUSIONES

El aceite esencial obtenido por el método de hidrodestilación de las hojas de *Ophryosporus peruvianus* colectados en Andahuaylillas durante la estación de diciembre-2018 a abril-2019 presenta una composición química muy variada desde monoterpenos oxigenados, hidrocarburos sesquiterpénicos, sesquiterpenos oxigenados, diterpenos oxigenados. Los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los cinco meses de colecta fueron los hidrocarburos sesquiterpénicos β -cariofileno, (Z)- β -farneseno y β -sesquifelandreno.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el financiamiento del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería, Proyecto de Investigación Formativa 2019 (FIQT-MF-2-2019).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fürstenberg-Hägg J, Zagrobelny M, Bak S. Plant defense against insect herbivores. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 10242 – 10297.
2. De oliveira TS, Bombo AB, De oliveira ASS, Garcia VL, Appezzato da GB. Seasonal variation of the essential oil two Brazilian native *Aldama* La LLave (Asteraceae) species. *An Acad Bras Cienc.* 2016; 88(3 suppl.): 1899-1907.
3. Deschamps C, Zanatta J, Bizzo H, Oliveira M, Roswalka L. Seasonal evaluation of essential oil yield of mint species. *Ciênc Agrotec.* 2008; 32 (3): 725 –730.
4. Guzmán-Lúcio MA, Wendt T, Simpson B, Alvarado-Vázquez MA, Foroughbakhch-Pournavab R, González-Álvarez M, Rocha-Estrada A. Listado florístico de especies anuales de floración invernal en el noreste de Nuevo León, México. *Rev Mex Biodivers.* 2013; 84: 884 – 893.
5. Rahman AHMM, Alam MS, Khan SK, Ahmed F, Islam AKMR, Rahman MM. Taxonomic studies on the family Asteraceae (Compositae) of the Rajshahi Division. *Res J Agric & Biol Sci.* 2008; 4(2): 134 – 140.
6. Sagástegui Alva A, Rodríguez Rodríguez EF. Una nueva especie de *Ophryosporus* (Eupatorieae: Asteraceae) para el Perú. *Rev Perú Biol.* 2008; 15(1): 21 – 23.
7. Montenegro LCA. Estudio Químico del Aceite Esencial del Te Inka (*Ophryosporus peruvianus*). [Tesis de licenciatura]. Lima: Universidad Nacional de Ingeniería; 2001.
8. Quinteros GYM. Etnobotánica y revaloración de los conocimientos tradicionales de la flora medicinal en Cajatambo, Lima. [Tesis de maestría]. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú. 2009.
9. Bohlmann F, Wallmeyer M, King RM, Robinson H. 2-Oxo-labda-8(17),13-Dien-15-ol from *Ophryosporus chilca*. *Phytochem.* 1984; 23(4): 1513 – 1514
10. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Ed. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation. 2007.

11. Arze JBL, Collin G, Garneau F-X, Jean F-I, Gagnon H. Essential oil from Bolivia II. Asteraceae: *Ophryosporus heptanthus* (Wedd.) H. Rob. Et King. J Essent Oil Res. 2004; 16(4): 374 – 376.
12. Niemeyer H. Composition of essential oils from five aromatic species of Asteraceae. J Essent Oil Res. 2009; 21(4): 350 – 353.
13. Garneau F-X, Collin GJ, Jean F-I, Gagnon H, Arze JBL. Essential oil from Bolivia XII Asteraceae: *Ophryosporus piquerioides* (D.C.) Benth. ex Baker. J Essent Oil Res. 2013; 25(5): 388 – 394.
14. Machado K Da C, Islam MT, Ali ES, Rouf R, Uddin SJ, Dev S, *et al.* A Systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene. Phytother Res. 2018; 32(12): 2376 – 2388.
15. Peña-Montes DJ, Huerta-Cervantes M, Ríos-Silva M, Trujillo X, Huerta M, *et al.* Protective effect of the hexanic extract of *Eryngium carlinae* Inflorescences In vitro, in Yeast, and in Streptozotocin-Induced diabetic male rats. Antioxidants (Basel). 2019 Mar 26;8(3):73. doi: 10.3390/antiox8030073.
16. Tyagi AK, Prasad S, Yuan W, Li S, Aggarwal BB. Identification of a novel compound (β -sesquiphellandrene) from turmeric (*Curcuma longa*) with anticancer potential: comparison with curcumin. Invest New Drugs.. 2015; 33: 1175 – 1186.



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