

ISSN 1810-634X

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 82 N° 4
OCTUBRE - DICIEMBRE - 2016



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

Presidenta : Ana María Muñoz Jáuregui
Editor en Jefe : Ana Cecilia Valderrama Negrón
Miembros : Julio Santiago Contreras
Lisveth Flores Del Pino
Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

Comité Consultivo

Caramantin Soriano, María
Universidad de Talca, Chile
Dávalos Prado, Juan
**Consejo Superior de Investigaciones
Científicas de España**
Calvo Buendía, Eduardo
Univ. Nac. Mayor de San Marcos – Perú
Guija Poma, Emilio
Universidad Científica del Sur – Perú
Muñoz Jáuregui, Ana
Universidad San Ignacio de Loyola
Lock Sing, Olga
Pontificia Universidad Católica del Perú
Santiago Contreras, Julio
Univ. Nac. Mayor de San Marcos – Perú
Valderrama Negrón, Ana
Univ. Nac. de Ingeniería, Perú
De La Cruz Azabache, Mario

Univ. Nac. de Ingeniería, Perú
Picasso Escobar, Gino
Univ. Nac. de Ingeniería, Perú
Rueda Sánchez, Juan Carlos
Pontificia Universidad Católica del Perú
Rabinovich Jaitin, Daniel
University of North Carolina – USA
Sun Kou, María del Rosario
Dpto. Ciencias, Sec. Química PUCP
Gutiérrez Correa, Marcel
Univ. Nac. Agraria La Molina – Perú
La Rosa-Toro Gómez, Adolfo
Univ. Nac. de Ingeniería, Perú
Alarcón Cavero, Hugo
Univ. Nac. de Ingeniería – Perú
Maza Mejía, Ily
Univ. Nac. de Ingeniería, Perú
Gamboa Fuentes, Nadia
Pontificia Universidad Católica del Perú

Revista indizada en el Chemical Abstracts, SciELO y Latindex

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

Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú

Teléfono (511) 472-3925

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 82

OCTUBRE - DICIEMBRE 2016

N°4

En el Perú: N° suelto S/.15

Suscripción anual: S/. 60.00

En el extranjero: Suscripción anual: \$50.00

CONTENIDO
(Vol. 82 – N° 4 – 2016)

Editorial	387
Trabajos Originales	
- Evaluación del proceso de remoción de Cr(VI) con compost de residuos de cultivo de clavel en disoluciones acuosas, por Elianna Castillo, Claudia Vargas, Pedro F. B. Brandão, Jesús Ágreda.	389
- Estudio de la biosorción de plomo divalente de soluciones acuosas usando biomasa modificada de marlo de maíz (<i>Zea mays</i>), por Carmencita Lavado Meza, Franklin Oré Jiménez.	403
- Calificación de la equivalencia farmacéutica <i>in vitro</i> por la metodología HPLC de cuatro medicamentos conteniendo paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas, por Jhonnell Samaniego Joaquín, Gladys Arias Arroyo.	415
- Evaluación de ocratoxina A en <i>Theobroma cacao</i> L. “cacao blanco” durante el proceso de cosecha, fermentado, secado y almacenado, por Norma Ramos, Américo Castro, José Juárez, Otilia Acha de la Cruz, Nadia Rodríguez, Jesús Blancas, Jackeline Escudero, Arnaldo Navarro.	431
- Evaluación y tratamiento de efluentes del remojo convencional y enzimático de pieles, por precipitación de proteínas y coagulación, por Yasmín Liseth Castañeda C., Rocío Vargas P., Mary Flor Césare C., Lizardo Visitación F.	440
- Optimización del proceso Fenton en el tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios, por Carlos Javier Medina Valderrama, Edgar Michel Montero del Aguila, Liz Erika Cruz Pio.	454
- Desarrollo de micropartículas de quitosano cuaternizado y entrecruzado para la adsorción de ácido desoxirribonucleico (ADN), por José L. Cconislla Bello, Christian Jacinto, Ily Maza, Martha Jahuirra, Alejandra Pando, Holger Mayta, Ana Valderrama.	467
- Optimización del proceso de inmovilización de lipasa producida por <i>Marinobacter sp</i> CH27 en octadecilo-sepabead, por Yadira Fernández Jeri, Amparo I. Zavaleta, Ana María Muñoz Jáuregui.	480
- Síntesis de catalizadores basados en óxidos mixtos de Ni-Ti para la producción de etileno a partir de la deshidrogenación catalítica del etano, por Daisy Unsihuaya, Gino Picasso, Rosario Sun Kou.	491
Informaciones	505
Índice de Materias	507
Índice de Autores	511

Revista Arbitrada

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

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

If the authors reside abroad US \$ 110,00

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

Formato para los artículos

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

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

Editorial

Las micotoxinas y salud

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por ciertas cepas de hongos al final de la fase de crecimiento, cuando han infestado productos agrícolas (cereales o frutos secos). La FAO estima que el 25% de las cosechas mundiales de granos se encuentran infectados por hongos toxicogénicos.

Desde el punto de vista de la contaminación de alimentos, las especies más relevantes pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium*.

La producción de las micotoxinas es afectada por factores extrínsecos: temperatura y humedad relativa, así como por factores intrínsecos: humedad, nutrientes, pH y acidez, además por el género del hongo toxicogénico.

Dentro de los principales grupos de micotoxinas se encuentran las aflatoxinas, las ocratoxinas, la zearalenona, las fumonisinas, el deoxivalenol, los tricotecenos, etc.

Algunas micotoxinas se destacan por su elevada toxicidad, como es el caso de las aflatoxinas que se encuentran entre los hepatocancerígenos naturales más potentes conocidos hasta ahora, otras pueden afectar el riñón (ocratoxina A, citrinina), el sistema nervioso (patulina, tremórgenos), o el aparato reproductor (zearalenona). Algunas presentan efectos tóxicos múltiples en el hombre y en los animales (tricotecenos) o están muy probablemente asociadas a la alta incidencia de cáncer de esófago en ciertas poblaciones (fumonisinas).

Las aflatoxinas, químicamente son metabolitos heterocíclicos, que están estrechamente relacionados entre sí, las más importantes son la aflatoxina B1 (que es metabolizada a aflatoxina M1), aflatoxina B2, aflatoxina G1 y aflatoxina G2; la aflatoxina B1 es la más común de las cuatro y presenta mayor toxicidad. El anillo lactónico y el doble enlace en la mitad del anillo difurano son los responsables de su toxicidad. Las aflatoxinas son compuestos altamente ionizables y por ello muy reactivos, pudiendo modificar ADN, ARN y proteínas celulares; experimentalmente, se ha demostrado que entrañan un elevado potencial hepatotóxico, mutagénico y cancerígeno, por lo que se le considera la micotoxina de mayor riesgo para la salud humana. En el hígado, las enzimas p450 metabolizan la aflatoxina hacia una aflatoxina-8,9-exo-epóxido y, en menor medida, a una aflatoxina-8,9-endo-epóxido. La exo-epóxida es altamente reactiva y puede formar derivados con ADN, ARN y proteínas, y puede reaccionar con el gen supresor de tumores p53.

La Unión Europea estableció niveles de ingesta tolerable diaria (ITD) de 0,001-0,01 ug/kg de peso corporal por día para aflatoxina B1 y de 0,0002-0,014 para ocratoxina. También la Unión Europea estableció los límites de micotoxinas para alimentos de consumo humano que van desde 0,1-12 ug/kg para aflatoxina B1 y de 0,5-15 ug/kg para ocratoxinas; siendo los niveles más bajos los alimentos destinados para bebés.

Debemos evitar o disminuir alimentos con alto contenido de micotoxinas, promoviendo las buenas prácticas agrícolas, el manejo de enfermedades de las plantas y condiciones de almacenamiento adecuadas y además exigir un control de los niveles de micotoxinas en los productos alimenticios por parte de las autoridades reguladoras.

Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

EVALUACIÓN DEL PROCESO DE REMOCIÓN DE Cr(VI) CON COMPOST DE RESIDUOS DE CULTIVO DE CLAVEL EN DISOLUCIONES ACUOSAS

Elianna Castillo^a, Claudia Vargas^a, Pedro F. B. Brandão^a, Jesús A. Ágreda^a

RESUMEN

En este trabajo se presenta un estudio para determinar el mecanismo del proceso de remoción de Cr(VI) de disoluciones acuosas, usando como adsorbente un compost obtenido de residuos del cultivo de clavel. En primer lugar, se determinó si la microbiota presente en el material afecta la remoción de Cr(VI). Para esto se realizaron medidas respirométricas y se evaluó la capacidad de remoción usando compost esterilizado y sin esterilizar. Adicionalmente, se analizó el compost antes y después de llevar a cabo el proceso de remoción de Cr(VI), mediante cuantificación de grupos funcionales ácidos y seguimiento cinético de pH, conductividad y diferencia de potencial redox. Los resultados mostraron que, en las condiciones utilizadas, los microorganismos presentes en el compost no afectan el proceso de remoción de Cr(VI) y el mecanismo se puede describir mediante un modelo de adsorción acoplada a la reducción. Esta adsorción se debe principalmente a los grupos funcionales ácidos (carboxílicos y fenólico-hidroxílicos). Con esta información, se construyó un mecanismo de 7 pasos que describe satisfactoriamente el proceso de remoción estudiado. El conjunto de constantes cinéticas del mecanismo propuesto se optimizó usando el análisis de sensibilidad. Finalmente, el mecanismo propuesto se verificó mediante simulaciones numéricas, encontrando buena concordancia entre los datos experimentales y los simulados.

Palabras clave: Remoción de Cr(VI), compost, medidas respirométricas, medidas cinéticas, conductividad, diferencia de potencial redox, residuos de cultivo de clavel.

EVALUATION OF Cr(VI) REMOVAL PROCESS IN AQUEOUS SOLUTIONS USING CARNATION CROP WASTE COMPOST

ABSTRACT

This paper presents a study that aimed to determine the mechanism of a process for Cr(VI) removal from aqueous solutions, using compost of carnation crop residues as the adsorbent. We assessed whether the microbiota present in the absorbent material affected the removal of Cr(VI) using respirometric measurements and evaluating the removal capacity using sterilized and not sterilized compost. Additionally, the compost was analysed before and after

^a Grupo de estudios para la Remediación y Mitigación de Impactos Negativos al Ambiente - GERMINA, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá, Av Cra 30 No. 45 - 03, Bogotá D.C., Código Postal 111321, Colombia.

* ecastillo@unal.edu.co

carrying out the Cr(VI) removal process, by quantification of the acidic functional groups and kinetic monitoring of pH, conductivity and redox potential difference. The results showed that, under the conditions used, the microorganisms present in the compost did not affect the process of Cr(VI) removal and that the mechanism can be described by an adsorption model coupled to the reduction, where this adsorption is mainly done on the acidic functional groups (carboxylic and phenolic-hydroxylic). Based on this information, a mechanism of 7 reactions was constructed to describe the removal process. The kinetic constants for each reaction were optimized with a sensitivity analysis process. The proposed mechanism was verified by numerical simulations and a good agreement was found between experimental and simulated data.

Key words: Removal of Cr(VI), compost, respirometric measures, kinetic measurements, conductivity, redox potential difference, carnation crop waste.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de biorremediación son cada vez más utilizados para la remoción de metales pesados¹. Por ejemplo, la remoción de Cr(VI) de aguas contaminadas utilizando compost como adsorbente. El compost es un material con alto contenido de materia orgánica que usualmente se emplea para la recuperación y adecuación de suelos; además, se ha demostrado que también puede ser utilizado como adsorbente para la remoción de metales tóxicos².

En trabajos anteriores del grupo de investigación^{3,4} se ha encontrado que el compost obtenido a partir de la estabilización de residuos del cultivo de claveles, producidos en la sabana de Bogotá, puede ser utilizado para remover Cr(VI) de disoluciones acuosas. En las condiciones óptimas encontradas (pH 2,0; dosis de adsorbente 1 g/100 mL de disolución; y tiempo de contacto 3 h), la isoterma de adsorción se ajustó satisfactoriamente al modelo de Langmuir, encontrando una capacidad máxima de adsorción de 6,25 mg/g, valor comparable con otros materiales adsorbentes de bajo costo. Además, se reportó una aproximación físico-química al mecanismo de dicha remoción, la cual está soportada en estudios de espectroscopia FTIR y microscopía SEM, antes y después del proceso de remoción³.

El mecanismo de remoción de Cr(VI) con estos materiales no es fácil de entender, en gran parte por la heterogeneidad del material. Por esta razón, existen pocos estudios al respecto los cuales se pueden resumir en las siguientes etapas: 1) mecanismo de reducción directa: en este caso se propone que el Cr(VI) se reduce a Cr(III), el cual luego es expulsado hacia la fase acuosa; 2) mecanismo de “adsorción acoplado a la reducción”, en este caso se proponen 3 etapas: (i) el Cr(VI) se enlaza a la superficie del bioadsorbente mediante atracción electrostática con los grupos cargados positivamente; (ii) el Cr(VI) se reduce a Cr(III) debido a los grupos electro-donores adyacentes al Cr(VI) adsorbido; y (iii) el Cr(III) generado sobre la superficie del bioadsorbente es expulsado a la fase acuosa debido a la repulsión electrónica entre los grupos cargados positivamente de la superficie y el Cr(III) generado⁵. Por otro lado, diferentes autores mostraron, mediante análisis espectroscópicos, que el Cr(III) que se genera después de la reducción del Cr(VI) puede quedar retenido en la superficie del material⁶.

El objetivo de este trabajo es profundizar en los detalles del mecanismo de remoción del Cr usando compost como material adsorbente, en condiciones previamente optimizadas y reportadas³. En busca de este objetivo, se realizaron estudios, biológicos y fisicoquímicos, para establecer un mecanismo más detallado. Se evaluó, entonces, si la microbiota presente en el material afecta la remoción de Cr(VI); para esto, se realizaron medidas respirométricas y se evaluó la capacidad de remoción usando compost esterilizado y sin esterilizar. Posteriormente, se llevó a cabo un estudio cinético del proceso de remoción mediante el seguimiento simultáneo de pH, conductividad y diferencia de potencial redox. El mecanismo propuesto se verificó mediante simulaciones numéricas, las cuales presentaron buena concordancia con los datos experimentales.

PARTE EXPERIMENTAL

Caracterización del compost

El material adsorbente usado para todos los ensayos fue un compost comercial (Ferticompost®), comercializado por la empresa Compostar Ltda., y elaborado a partir de la estabilización de los residuos de clavel generados por la empresa Flores de Serrezuela S.A., Bogotá, Colombia. Este material, se secó a temperatura ambiente y se realizó su caracterización. Se determinaron los parámetros fisicoquímicos exigidos en la Norma Técnica Colombiana NTC5167 del 2004 (pH, conductividad, densidad, porcentaje de humedad, contenido de cenizas, nitrógeno, carbono orgánico oxidable y capacidad de intercambio catiónico). La composición elemental se determinó mediante fluorescencia de rayos-X (FRX), gracias a la ayuda del *Servicio Geológico Colombiano** y utilizando un instrumento AXIOS MINERALS (Panalytical). La evaluación de las características texturales del compost se realizó a partir de isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno a 77 °K. El área superficial del compost se estimó mediante el modelo BET⁷.

Efecto de la esterilización del compost en la remoción de Cr(VI)

Para evaluar si los microorganismos vivos del biomaterial presentan efectos metabólicos en el proceso de remoción de Cr(VI), se construyó una isoterma de adsorción con compost esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 121°C. Además, y mediante estudios respirométricos, se comprobó la actividad microbiológica del compost antes y después del proceso de remoción. La isoterma de adsorción se realizó en el intervalo de concentraciones iniciales de Cr(VI) de 15 mg/L a 200 mg/L, en las mejores condiciones experimentales encontradas en un estudio previo³: relación de 100 mL de disolución por cada gramo de compost (con tamaño de partícula menor a 180 µm), tiempo de agitación de 3 h a 36 rpm y pH inicial de 2,0. Los resultados se presentan en términos de % de remoción usando la relación:

$$\% \text{ de Remoción} = \frac{(C_0 - C_e)}{C_0} * 100 \quad 1$$

En donde, C_0 y C_e son, respectivamente, las concentraciones iniciales y de equilibrio de Cr(VI).

Medidas respirométricas

Las medidas respirométricas se realizaron siguiendo la metodología de Barrena y colaboradores⁸, la cual se describe brevemente a continuación: 10g de compost, previamente humectada hasta alcanzar una humedad cercana al 60% e incubada durante 24 horas a 25°C, fue colocada en un erlenmeyer de 500 mL, el cual contenía un recipiente con 10 mL de NaOH 0,04 M, durante 24 h a 25 °C; el CO₂ producido se determinó mediante titulación de la muestra de NaOH con HCl 0,04 M.

Cuantificación de grupos funcionales ácidos

La cuantificación de los grupos funcionales ácidos presentes en el compost, antes y después de remover Cr(VI), se realizó mediante la determinación de los diferentes tipos de acidez presentes en el compost: acidez total, acidez proveniente de grupos carboxílicos y acidez proveniente de los grupos fenólicos e hidroxílicos⁹.

La acidez total se determinó agitando durante 24 h, 150 mg de muestra con 20 mL de Ba(OH)₂ 0,2 M. Una vez finalizado este período, las muestras se filtraron usando papel Watman 45 y el filtrado se tituló potenciométricamente con HCl 0,40 M hasta alcanzar pH 8,4. La acidez total se calculó mediante la siguiente expresión:

$$Acidez\ Total\ \left(\frac{mmol}{g}\right) = \frac{(V_B - V_m) * M_{HCl}}{P_w} \quad 2$$

donde, V_B es el volumen gastado en la titulación del blanco (mL), V_m es el volumen gastado en la titulación de la muestra (mL), M_{HCl} es la concentración molar de HCl y P_w es el peso de la muestra (g).

La determinación de la acidez proveniente de los grupos carboxílicos se realizó agitando 150 mg de muestra con 10 mL de Ca(CH₃COO)₂ 1 M en 40 mL de agua desionizada durante 24 h. Las muestras se filtraron usando papel Watman 42 y el filtrado se tituló con NaOH 0,1 M. La acidez proveniente de los grupos carboxílicos se calculó usando la ecuación:

$$Acidez\ grupos\ carboxílicos\ \left(\frac{mmol}{g}\right) = \frac{(V_m - V_B) * M_{NaOH}}{P_w} \quad 3$$

en donde, V_B es el volumen gastado en la titulación del blanco (mL), V_m es el volumen gastado en la titulación de la muestra (mL), M_{NaOH} es la concentración molar del NaOH y P_w es el peso de la muestra (g). La acidez proveniente de los grupos fenólicos e hidroxílicos se calculó como la diferencia de la acidez total y de la acidez proveniente de los grupos carboxílicos.

Estudio cinético: pH, conductividad y diferencia de potencial redox

Los estudios cinéticos se hicieron tomando como referencia las condiciones optimizadas en un trabajo anterior³. Para el registro de los datos se utilizó un potenciostato eDAQ e-corder

210 conectado a una interface pH & ISE IsoPod EP 353, sistema con el cual se midió el pH y la diferencia de potencial redox. La conductividad se siguió usando una interface conductivity IsoPod EP 357.

Reactivos y disoluciones

La calibración del electrodo de pH se realizó utilizando reguladores de pH 7,00 y $4,00 \pm 0,01$ (Merck). La calibración del electrodo redox se llevó a cabo utilizando las mismas disoluciones de pH 7,00 y $4,00 \pm 0,01$, pero ahora saturadas con quinhidrona. El electrodo de conductividad se calibró con disoluciones de KCl $0,0100 \pm 0,0001$ M y $0,0010 \pm 0,0001$ M. Ensayos para el estudio cinético

El estudio cinético del proceso de remoción se realizó siguiendo el esquema que se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Experimentos usados para el estudio cinético de adsorción de Cr(VI) sobre compost.

Experimento	Agua desionizada (50 mL)	Disolución de Cr(VI) 50 mg/L (50 mL)	Compost (0,5 g)	pH inicial ajustado a 2,0
1	√		√	
2	√		√	√
3		√		√
4		√	√	
5		√	√	√

Ajustes no lineales y simulaciones

Las regresiones no lineales se realizaron usando el software R (R versión 2.13.0 Copyright® 2011, The R Foundation for Statistical Computing). Las simulaciones numéricas se realizaron usando un programa de computadora escrito en FORTRAN, que usa la subrutina de integración LSODE¹⁰.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del compost

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del compost Ferticompost® se presentan en la tabla 2. Los resultados de esta caracterización se compararon con la norma técnica colombiana NTC5167, en la que se estipulan las condiciones que debe cumplir un material usado para la enmienda de suelos en Colombia. Al evaluar los resultados se puede inferir que el compost Ferticompost® cumple con los parámetros establecidos para ser usado como enmienda orgánica en Colombia.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del compost.

Parámetro	Unidades	Resultado	NTC 5167
Humedad	%	23,1±0,7	Máximo 35
Cenizas	%	44,8 ±1,8	Máximo 60
Carbono orgánico oxidable	%	19,9±1,7	Mínimo 15
Capacidad de intercambio catiónico	meq/100g	49,4±0,7	Mínimo 30
Densidad	g/cm ³	0,33±0,01	Máximo 0,6
pH	-	6,86±0,2	4-9
P ₂ O ₅	%	1,04±0,08	-
Nitrógeno	%	0,89±0,07	-
C/N	-	21,89	-
Capacidad de retención de agua	%	137,5±0,4	Mínimo 100

A partir de los datos de la isoterma de adsorción-desorción de N₂ a 77°K, se obtuvo un área superficial de 6,7 m²/g del compost. Comparando este valor con el reportado para otros adsorbentes usados en la remoción de Cr(VI), se concluye que, a pesar de ser un valor bajo, presenta un área superficial mayor que materiales adsorbentes similares como por ejemplo la fibra de coco (0,8m²/g), residuos de uva (5,3 m²/g) o las cenizas (6,4 m²/g) ³.

Actividad metabólica de los microorganismos en el compost

Para evaluar el efecto de la actividad metabólica de los microorganismos presentes en el compost en la remoción de Cr(VI), se llevó a cabo el proceso de remoción a diferentes concentraciones iniciales del metal usando el compost esterilizado y sin esterilizar. En la figura 1, se puede observar que la remoción usando compost esterilizado es similar al compost sin esterilizar, lo cual sugiere que no hay un efecto metabólico de los microorganismos presentes en el compost que contribuya al proceso de remoción del metal. Por lo tanto, se considera que el proceso de remoción es netamente fisicoquímico. Este resultado difiere de otros autores¹¹, quienes mostraron que la remoción de Cr(VI) está ligada con la actividad microbiológica presente en el compost. Estos resultados, posiblemente, son diferentes debido a que nuestros ensayos de remoción se realizaron a pH inicial de 2,0 mientras que los realizados por esos autores fueron con el compost a pH 8,4. Esto implica que a pH 2,0 los microorganismos ya estarían inactivos, inclusive en el compost sin esterilizar.

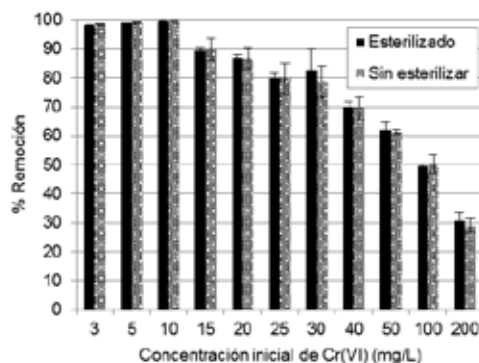


Figura 1. Evaluación del efecto del uso de compost esterilizado o sin esterilizar para la remoción de distintas concentraciones de Cr(VI). Condiciones iniciales: pH 2,0; 1 g de compost por cada 100 mL de disolución; agitación circular a 36 rpm y tiempo de agitación de 3 horas.

Pruebas respirométricas

Las medidas respirométricas están relacionadas con la actividad microbiológica de los microorganismos presentes en el compost. En los ensayos realizados se encontraron valores de índices respirométricos de $0,48 \pm 0,07$ y $0,21 \pm 0,07$ (mg CO₂/g), antes y después del proceso de remoción respectivamente, lo cual sugiere que los microorganismos presentes en el compost fueron afectados negativamente por la presencia del metal, indicando una disminución en la actividad metabólica de los microorganismos después del proceso de remoción de Cr(VI).

Cuantificación de grupos funcionales ácidos

Los resultados obtenidos para la cuantificación de grupos ácidos (grupos carboxílicos, fenólicos e hidroxílicos) se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Cuantificación de grupos ácidos del compost antes y después de la remoción de Cr(VI).

Remoción de Cr(VI)	Tipo de acidez (mmol/g)		
	Acidez total	Grupos carboxílicos	Grupos fenólicos-hidroxílicos
ANTES	2,60±0,13	0,08±0,03	2,52±0,14
DESPUÉS	1,45±0,56	0,47±0,03	0,97±0,55

Se observa que el compost estudiado tiene mayor cantidad de grupos fenólicos que carboxílicos, tendencia que se mantiene antes y después de la remoción del Cr(VI) y a pesar del aumento significativo de los grupos carboxílicos luego de la remoción del metal. De otro lado, el aumento de los grupos carboxílicos, tras la remoción del Cr(VI), es consistente con la reducción del metal a Cr(III), hecho que ya fue mencionado anteriormente y que será incluido en el mecanismo que se propone más adelante. Estos resultados son comparables con trabajos previos^{6,7} en donde se ha demostrado, con estudios de FT-IR, que el compost antes y después de la remoción del Cr(VI), presenta interacciones con el metal a través de sus grupos funcionales, principalmente grupos fenólicos e hidroxílicos.

Además, se observa una disminución en la acidez total del compost cuando este está cargado con Cr(VI), lo cual evidencia que este metal se adsorbe sobre este tipo de grupos funcionales como lo han establecido otros autores mediante medidas espectroscópicas⁶. A partir de estos resultados, se decidió estudiar el efecto del pH, la diferencia de potencial redox y la conductividad durante el proceso de remoción del Cr(VI) con el compost en cuestión. Todo esto, con el objetivo de encontrar pistas que ayuden a elucidar el mecanismo de remoción del Cr(VI) con el compost.

Estudio cinético: mediciones de pH

El comportamiento del pH, para los 5 experimentos descritos en la tabla 1 de la sección experimental, se presenta en la figura 2. Se pueden observar tres tendencias: 1) dos disoluciones cuyo pH inicial no fue ajustado a 2,0 (compost en agua y compost en agua con Cr(VI)): estas tendencias muestran la naturaleza ligeramente básica del compost y, además,

se puede observar que cuando al compost en agua (trazo superior de la figura) se le agrega Cr(VI), el pH descende un poco debido a la naturaleza ácida de las disoluciones acuosas de cromo; 2) disolución de Cr(VI) cuyo pH inicial se ajustó a 2,0: en este caso se observa que el pH disminuye, tendiendo a tiempos largos a un valor alrededor de pH 1,9; y 3) disoluciones que tienen compost con y sin cromo y a las que se les ajustó el pH inicial a un valor de 2,0: en este caso el pH tiende a aumentar con el tiempo.

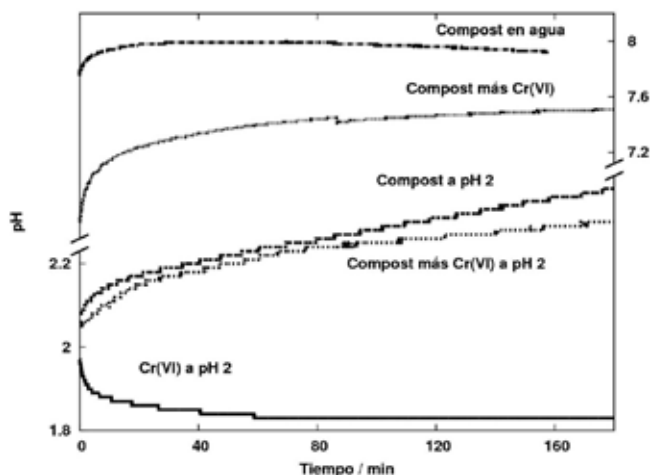


Figura 2. Cinética de la adsorción de Cr(VI) sobre compost. Medidas de pH en función del tiempo para los 5 experimentos descritos en la tabla 1. Para obtener mayor claridad en la figura, los datos de la disolución de compost a pH 2,0, sin Cr(VI), fueron desplazados en -0,04 unidades de pH.

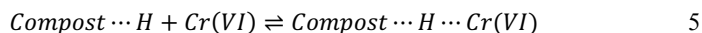
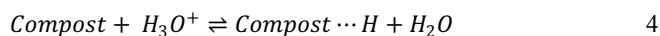
Estos dos últimos conjuntos de datos experimentales se ajustaron a una cinética de orden 2, utilizando una regresión no lineal. Los resultados del ajuste se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Ajuste no lineal a una cinética de orden 2 de los datos experimentales de $[H_3O^+]$ en función del tiempo.

Ecuación a la que se ajustaron los datos: $[H_3O^+] = \frac{[H_3O^+]_0([H_3O^+]_0 - A_0)}{[H_3O^+]_0 - A_0 e^{-([H_3O^+]_0 - A_0)kt}}$				
	Compost pH inicial 2,0		Compost más Cr(VI) pH inicial 2,0	
	Valor	Error estándar	Valor	Error estándar
A_0 / mM	5,47	0,03	3,614	0,004
$[H_3O^+]_0 / \text{mM}$	7,947	0,004	8,603	0,004
$k / \text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	$9,75 \times 10^{-4}$	8×10^{-6}	$2,861 \times 10^{-3}$	9×10^{-6}
Error estándar residual	0,1		0,09	
Tolerancia en la convergencia	6×10^{-6}		5×10^{-6}	

Estos dos experimentos, a pH inicial de 2,0 con y sin Cr(VI), resultan importantes ya que se ha demostrado, y se confirmará más adelante, que la protonación del compost es un

requisito que debe ser cumplido antes de que el $Cr(VI)$ se pueda adsorber¹². Así, el proceso de adsorción de $Cr(VI)$ sobre el compost, obtenido de residuos del cultivo de claveles, puede ser representado por una reacción de segundo orden entre el $Cr(VI)$ y la superficie del compost, el cual ocurre siempre y cuando el compost esté previamente protonado. Asimismo, como se muestra en la tabla 4, la protonación del compost es un proceso de segundo orden. Estos hechos experimentales se pueden representar con las siguientes ecuaciones:



Estudio cinético: mediciones de conductividad y potencial redox

La conductividad en función del tiempo de la disolución de $Cr(VI)$ en contacto con el compost a pH 2,0 sigue la misma tendencia observada para la concentración del ión hidronio, esto es, disminuye en función del tiempo (figura 3a). Este comportamiento se puede explicar en virtud de que el ion H_3O^+ es la especie en disolución acuosa con mayor conductividad molar específica, por lo que el cambio en su concentración tiene efecto definitivo sobre la conductividad de la disolución.

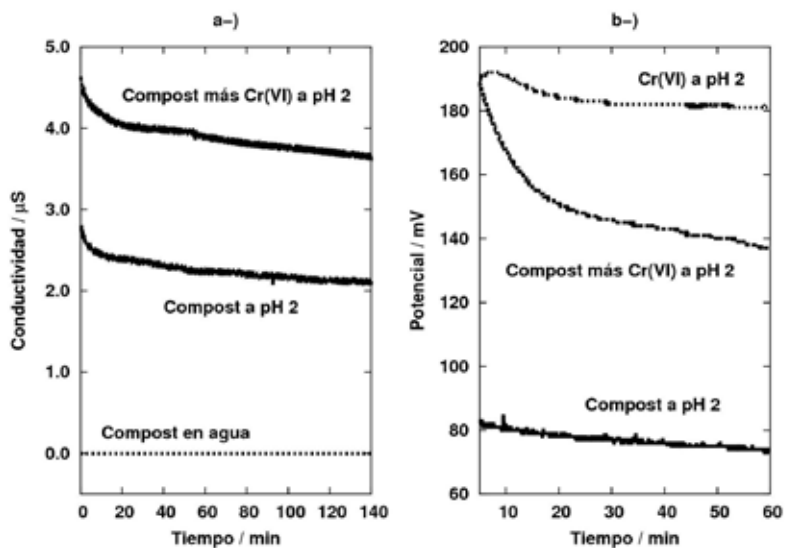


Figura 3. Cinética de la adsorción de $Cr(VI)$ sobre compost. Medidas de: a) conductividad en función del tiempo y b) diferencia de potencial redox en función del tiempo.

Por otro lado, pueden existir especies conductoras en disolución, liberadas a la misma por el compost. En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos de la composición elemental del compost evaluado, empleando FRX. Los metales y sus aniones asociados pueden, eventualmente, pasar a la disolución y contribuir a la conductividad de la misma.

Tabla 5. Composición elemental del compost utilizado para el estudio de remoción de Cr(VI) de aguas contaminadas. El análisis se realizó utilizando FRX.

Elemento expresado como óxido	Contenido porcentual (%)	Elemento expresado como óxido	Contenido porcentual (%)	Elemento expresado como óxido	Contenido porcentual (%)
Al ₂ O ₃	6,23	MgO	1,64	SrO	0,042
BaO	0,025	Mn ₃ O ₄	0,133	TiO ₂	0,23
CaO	6,85	Na ₂ O	0,79	V ₂ O ₅	0,008
Cr ₂ O ₃	0,002	NiO	0,001	ZnO	0,024
CuO	0,034	P ₂ O ₅	2,153	ZrO ₂	0,01
Fe ₂ O ₃	1,37	SiO ₂	40,78	-	-
K ₂ O	1,64	SO ₃	1,17	-	-

La presencia de diferentes iones en disolución, hace difícil asociar las medidas de conductividad con una especie en particular, dado que las medidas de conductividad no son selectivas. Como consecuencia de esto, los registros de conductividad no mostraron un ajuste aceptable a cinéticas de orden 2. Sin embargo, como lo muestra la figura 3a, la tendencia de la conductividad a disminuir con el tiempo es consistente con las expresiones descritas previamente sobre la protonación del compost, dado que en ellas se muestra que las especies cargadas eléctricamente (particularmente el ión H₃O⁺) son eliminadas de la disolución, lo que lleva a que la conductividad disminuya.

En cuanto a las lecturas de la diferencia de potencial redox, los resultados mostraron que el Cr(VI) se reduce por acción del compost, como se puede observar en la figura 3b. Estos resultados indican que la reducción del Cr(VI) se lleva a cabo en la superficie protonada del compost, como se ha mostrado en otros estudios de reducción de Cr(VI) en otros biomateriales en condiciones ácidas¹³. Sin embargo, al igual que en el caso de las medidas de conductividad, los registros de diferencia de potencial redox no se pueden asociar a una sola especie en particular, por esta razón, no hubo un buen ajuste a cinéticas de orden 2.

Propuesta de mecanismo de remoción

Basados en la evidencia experimental anterior, a saber: la cinética de segundo orden para el cambio de [H₃O⁺] en función del tiempo, reducción del Cr(VI) sobre el compost y cinética de segundo orden para la adsorción del cromo sobre el compost; y considerando la información disponible en la literatura, a continuación se propone el mecanismo que se presenta en la tabla 6 para la adsorción de Cr(VI) sobre el compost de residuos de claveles partiendo de un pH de 2,0.

Tabla 6. Mecanismo de reacción propuesto para la adsorción de $Cr(VI)$ sobre compost elaborado con residuos del cultivo de clavel de la sabana de Bogotá. El pH inicial se ajustó a 2,0.

Reacción	Constante cinética	Número
$S_{red} + H_3O^+ \rightleftharpoons S_{red} \cdots H + H_2O$	$k_1=8,0 \times 10^{-3}$; $k_{-1}=1,9 \times 10^{-3}$	(1)
$S_{red} \cdots H + Cr(VI) \rightleftharpoons S_{red} \cdots H \cdots Cr(VI)$	$k_2=2,8 \times 10^3$; $k_{-2}=1,0 \times 10^{-3}$	(2)
$S_{red} \cdots H \cdots Cr(VI) \rightleftharpoons S_{ox} \cdots H \cdots Cr(III)$	$k_3=1,9 \times 10^3$; $k_{-3}=1,0 \times 10^{-3}$	(3)
$S_{ox} \cdots H \cdots Cr(III) \rightleftharpoons S_{ox} \cdots H + Cr(III)$	$k_4=1,0 \times 10^{-3}$; $k_{-4}=1,0 \times 10^{-3}$	(4)
$S_{red} \cdots H + Cr(VI) \rightleftharpoons S_{ox} \cdots H + Cr(III)$	$k_5=1,0 \times 10^2$; $k_{-5}=1,0$	(5)
$S_2 + Cr(III) \rightleftharpoons S_2 \cdots Cr(III)$	$k_6=1,0 \times 10^3$; $k_{-6}=1,0 \times 10^{-2}$	(6)
$S_{red} + H_3O^+ \rightleftharpoons S_D$	$k_7=2,7 \times 10^{-2}$; $k_{-7}=0$	(7)

Nota: la letra S representa la superficie del compost en diversas formas: reducida, S_{red} ; reducida y protonada, $S_{red} \cdots H$; con $Cr(VI)$ adsorbido, $S_{red} \cdots H \cdots Cr(VI)$; oxidada y con $Cr(III)$ adsorbido, $S_{ox} \cdots H \cdots Cr(III)$; oxidada, $S_{ox} \cdots H$; una superficie específica para la adsorción del $Cr(III)$, S_2 ; superficie específica con $Cr(III)$ adsorbido, $S_2 \cdots Cr(III)$; y la superficie del compost degradada, S_D .

El mecanismo de la tabla 6 condensa los hechos experimentales encontrados en este trabajo con la información obtenida de la literatura. A continuación, se describe cada paso del mecanismo propuesto, sustentando cada uno de ellos, ya sea con los resultados experimentales obtenidos o con referencias pertinentes:

1. La superficie del compost debe protonarse antes de que pueda ocurrir la adsorción del $Cr(VI)$: sustentado por los resultados experimentales del presente trabajo, así como por lo reportado en literatura¹²; reacción número (1).
2. La protonación del compost sigue una cinética de segundo orden: corroborado experimentalmente en este trabajo (tabla 4) y reportado en la literatura³; reacción número (1).
3. La adsorción del $Cr(VI)$ sobre el compost sigue una cinética de orden 2: sustentado por la parte experimental de este trabajo (tabla 4) y reacción 2 reportada anteriormente³.
4. El $Cr(VI)$ se reduce por acción del compost: sustentado por la parte experimental de este trabajo (Figura 3b) y por lo reportado en la literatura¹⁴; reacciones número (3) y (5).
5. El $Cr(VI)$ se puede reducir, sin necesidad de adsorberse: reportado en la literatura¹⁵; reacción número (5).
6. El $Cr(III)$ generado por la reducción del $Cr(VI)$ pasa a la disolución, permitiendo las reacciones números (4) y (5), y se puede re-adsorber sobre el compost en un tipo de sitios activos diferentes a los iniciales: reportado en la referencia¹⁵; reacción número (6).
7. La reacción 7 se incluye para tener en cuenta el marcado decremento de la concentración de H_3O^+ que se observó experimentalmente, y que no es posible describir con las primeras 6 reacciones. Este último paso, se puede entender como la degradación de la superficie del compost debida a la acidez del medio.

Simulaciones numéricas del mecanismo propuesto

El anterior mecanismo fue puesto a prueba para saber hasta qué punto podía describir el comportamiento experimental observado. El proceso se realizó aplicando valores iniciales

estimados a las constantes cinéticas de las 7 reacciones del mecanismo los cuales, además, se optimizaron usando un proceso de análisis de sensibilidad¹⁶. Este análisis permitió identificar que las constantes cinéticas k_1 y k_{-1} del primer proceso (la protonación del compost, reacción número (1)), la constante k_2 de la reacción número (2) en el sentido directo (la adsorción del cromo hexavalente), y la constante k_7 del proceso irreversible de degradación del compost por acción del medio ácido (reacción número (7)), son las que mayor efecto tienen sobre el comportamiento de las simulaciones.

Finalmente, el análisis de sensibilidad acoplado a un proceso de optimización simplex, nos permitió ajustar los valores de las constantes cinéticas de todas las reacciones del mecanismo propuesto, obteniendo los valores que se muestran en la tabla 7. Esto generó una buena concordancia entre los resultados experimentales y las simulaciones, como se puede observar en la figura 4, en la que se presenta la concentración de los iones H_3O^+ medidos experimentalmente, y aquellos obtenidos mediante la simulación numérica usando el mecanismo propuesto de la tabla 6.

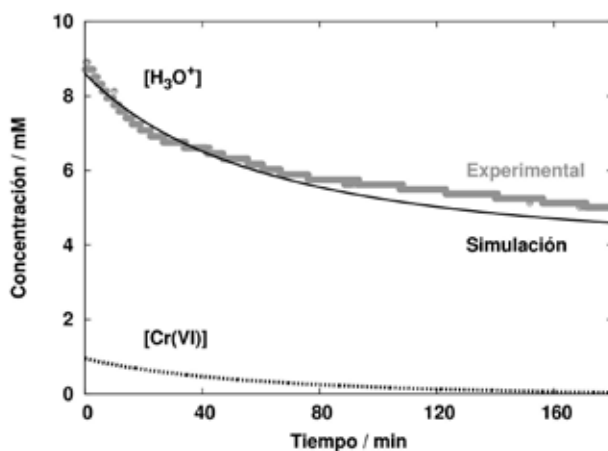


Figura 4. Resultados de la simulación numérica del mecanismo de reacción de la tabla 6. Se comparan los datos experimentales de la medición de la concentración de iones H_3O^+ con los obtenidos mediante la simulación. Adicionalmente, se presenta la concentración de $Cr(VI)$ en función del tiempo obtenida de la simulación.

La figura 4 muestra el perfil cinético, calculado con el modelo propuesto, para la concentración de $Cr(VI)$ y demuestra que el modelo es útil y capaz de describir lo que sucede cuando se adsorbe $Cr(VI)$ sobre compost de residuos de clavel. Esta información es valiosa (además del conocimiento básico del sistema) para futuras implementaciones del proceso de remoción de $Cr(VI)$ en aguas contaminadas utilizando compost, por ejemplo, a nivel de planta piloto.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que, en las condiciones utilizadas, el proceso de remoción de Cr(VI) afecta negativamente a los microorganismos presentes en el compost obtenido de residuos de cultivos de clavel de la sabana de Bogotá. Por tanto, el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo el proceso de remoción es netamente fisicoquímico. Además, se pudo establecer que el mecanismo para la remoción del Cr(VI) consta de 4 pasos fundamentales: a) Protonación del compost, el cual sigue una cinética de orden 2; b) Adsorción del Cr(VI) sobre los sitios protonados del compost, que también es un proceso cinético de orden 2; c) Reducción del Cr(VI) a Cr(III) previa adsorción del Cr(VI) y d) Liberación del Cr(III) desde el compost hacia la disolución.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Dirección Nacional de Investigación (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia, por la financiación a través del proyecto HERMES 12308.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hubbe MA, Hasan SH, Ducoste JJ. Cellulosic substrates for removal of pollutants from aqueous systems: A review. 1. Metals. *BioRes.* 2011; 6(2): 2161-2287.
2. Paradelo R, Barral MT. Evaluation of the potential capacity as biosorbents of two MSW composts with different Cu, Pb and Zn concentrations. *Bioresour Technol.* 2012;104:810-813.
3. Vargas C, Brandão PFB, Ágrede J, Castillo E. Bioadsorption using compost: An alternative for removal of chromium (VI) from aqueous solutions. *BioRes.* 2012; 7(3): 2711-2727.
4. Vargas C, Carriazo JG, Castillo E. Estudio de materiales adsorbentes de bajo costo para remover Cr(VI) de efluentes acuosos. *Ingeniería e Investigación.* 2011; 31(1): 154-162.
5. Park D, Lim S-R, Yun Y-S, Park JM. Development of a new Cr(VI)-biosorbent from agricultural biowaste. *Bioresour Technol.* 2008; 99(18):8810-8818.
6. Miretzky P, Cirelli AF. Cr(VI) and Cr(III) removal from aqueous solution by raw and modified lignocellulosic materials: a review. *J Hazard Mater.* 2010;180(1-3):1-19.
7. Leofanti G, Padovan M, Tozzola G, Venturelli B. Surface area and pore texture of catalysts. *Catal Today.* 1998;41(1-3):207-19.
8. Barrena R, Vázquez F, Gordillo MA, Gea T, Sánchez A. Respirometric assays at fixed and process temperatures to monitor composting process. *Bioresour Technol.* 2005;96(10):1153-1159.
9. Li Y, Yue Q, Gao B, Li Q, Li C. Adsorption thermodynamic and kinetic studies of dissolved chromium onto humic acids. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008;65(1):25-29.
10. Radhakrishnan K, Hindmarsh A. Description and Use of LSODE, the Livermore solver

- for ordinary Differential equations. NASA Reference publication 1327. Lawrence Livermore National Laboratory. Report UCRL-ID-113855, 1993.
11. Boni MR, Scaffoni S. The potential of compost-based biobarriers for Cr(VI) removal from contaminated groundwater: column test. *J Hazard Mater.* 2009;166(2-3):1087-1095.
 12. Cimino G, Passerini A, Toscano G. Removal of toxic cations and Cr(VI) from aqueous solution by hazelnut shell. *Water Res.* 2000; 34: 2955–2962.
 13. Agarwal GS, Bhuptawat HK, Chaudhari S. Biosorption of aqueous chromium(VI) by *Tamarindus indica* seeds. *Bioresour Technol.* 2006;97(7):949-956.
 14. Wei YL, Lee YC, Hsieh HF. XANES study of Cr sorbed by a kitchen waste compost from water. *Chemosphere.* 2005;61(7):1051-1060.
 15. Albadarin AB, Al-Muhtaseb AH, Al-laqtah NA, Walker GM, Allen SJ, Ahmad MNM. Biosorption of toxic chromium from aqueous phase by lignin: mechanism, effect of other metal ions and salts. *Chem Eng J.* 2011;169(1–3):20-30.
 16. Mendoza J. Estudio termocinético de la oxidación de fenol con peróxido de hidrógeno catalizada en fase homogénea y heterogénea. [Tesis de maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2011.

ESTUDIO DE LA BIOSORCIÓN DE PLOMO DIVALENTE DE SOLUCIONES ACUOSAS USANDO BIOMASA MODIFICADA DE MARLO DE MAÍZ (*Zea mays*)

Carmencita Lavado Meza^{*a}, Franklin Oré Jiménez^b

RESUMEN

Se estudió la remoción de los iones de Pb(II) de soluciones acuosas utilizando la biomasa del marlo de maíz modificado químicamente con una solución 0,2 M de NaOH, mediante un sistema batch, lográndose incrementar la capacidad de adsorción en un 40% frente a su similar sin modificar (ZM). El marlo de maíz modificado (MZM) se caracterizó por espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR) determinándose la presencia de grupos funcionales como OH y grupos carboxílicos los cuales estarían favoreciendo el proceso de biosorción, se determinó el área superficial siendo esta igual a 2,2 m²/g. Asimismo, se evaluó la capacidad de adsorción del MZM en función del tiempo de contacto, dosis del biosorbente, pH y concentración inicial de la solución de Pb (II). Las condiciones óptimas para la remoción de Pb(II) fueron 4g/L de MZM, tiempo de agitación de 60 minutos y pH igual a 5,0. Los datos cinéticos se ajustaron al modelo de Pseudo Segundo Orden, los datos experimentales de equilibrio se ajustaron mejor al modelo Langmuir, lo que indicaría una biosorción en monocapa. El MZM posee una capacidad máxima de biosorción de 12,44 mg/g.

Palabras clave: Plomo, biosorción, marlo de maíz modificado, biosorbentes de bajo costo.

STUDY OF LEAD DIVALENT BIOSORPTION FROM AQUEOUS SOLUTIONS USING CORNCOB BIOMASS MODIFIED (*zea mays*)

ABSTRACT

Removing ions Pb (II) was investigated from aqueous solutions using biomass corn cob chemically modified with a 0,2 M NaOH solution, using a batch system, achieving 40% increase in adsorption capacity compared to similar unmodified (ZM). The corncob modified (MZM) was characterized by infrared spectroscopy Fourier transform (FTIR) determining presence of functional groups such as OH and carboxylic groups which would favor biosorption process, the surface area was determined to be the equal to 2,2 m²/g. Likewise, adsorption capacity versus time MZM contact biosorbent dose, pH and initial concentration

^a Facultad de Ingeniería Ambiental de la Universidad Continental, Av. San Carlos 1980 - Huancayo, e-mail: clavado@continental.edu.pe

^b Facultad de Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210 - Rimac. Lima-Perú

of Pb (II) solution were evaluated. The optimal conditions for the removal of Pb (II) were 4g/L MZM, stirring time 60 minutes and pH equal to 5,0. The kinetic data were fitted to the model of Pseudo Second Order, experimental equilibrium data were better adjusted to the Langmuir model, which would indicate a monolayer biosorption. The MZM has a maximum capacity of biosorption of 12,44 mg / g.

Key words: Lead, biosorption , modified corncob , low cost biosorbents.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua con metales pesados es uno de los problemas ambientales más severos, debido a su toxicidad, persistencia y bioacumulación, convirtiéndose, así, en un riesgo para la salud humana y el medio ambiente.¹

El plomo es un metal pesado muy tóxico, sus efectos sobre la salud humana incluyen anemia, hipertensión, esterilidad, daño a los riñones y retardo mental.² Algunos métodos convencionales utilizados para la remoción de plomo de aguas residuales son: filtración con membrana, precipitación química e intercambio iónico, estas tecnologías muchas veces resultan no ser utilizadas por el alto costo de operación.³ La biosorción se puede definir como la retención de iones por material biológico no vivo a través de mecanismos fisicoquímicos, el proceso comprende la fase sólida (biosorbente) y la fase líquida (solvente, comúnmente agua) la cual contiene la especie disuelta a ser removida.⁴ La biosorción se presenta como un método atractivo debido a las ventajas que presenta, como bajo costo, ya que, generalmente se emplea biomasa sin aplicación industrial como restos orgánicos industriales y desechos agrícolas; asimismo, el material puede regenerarse, se puede retener el metal en presencia de otros cationes y es de fácil operación.⁵ Estudios recientes muestran óptimos resultados cuando el material (biomasa) presenta componentes estructurales como proteínas, polisacáridos o nucleótidos con diversos grupos funcionales como carbonilos, carboxilos, hidroxilos y grupos aminos o amidas; estos grupos tienen la capacidad de enlazar con los iones disueltos en la solución por atracción electrostática. Los materiales lignocelulósicos contienen uno o más de los grupos mencionados, donde la capacidad de interacción de estos con los iones depende del pH, temperatura, fuerza iónica del medio, características químicas del metal, así como la capacidad adsorbente, la cual, a su vez, depende de la especie periodo estival y zona geográfica. La modificación de la biomasa, ya sea química o física, busca incrementar el área superficial específica (entre el material bioadsorbente y el ion y/o entre el número de cargas y actividad de los grupos enlazantes) y de esta manera darle un valor agregado a la biomasa.⁶ El marlo de maíz (*Zea mays*) es un material lignocelulósico de desecho que se encuentra en abundancia en la región Junín, en Perú, por lo que se plantea la posibilidad de usarlo como biosorbente.

El presente estudio tuvo por objetivo investigar la capacidad de la biomasa modificada químicamente del marlo de maíz para remover Pb (II) de soluciones acuosas, determinar la influencia del pH, dosis de biosorbente, tiempo de adsorción y correlacionar los datos

experimentales de equilibrio y cinética de biosorción con los modelos matemáticos respectivos.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparación del biosorbente y la solución de Pb

El marlo de maíz fue recolectado en el distrito de Sicaya de la región Junín en Perú. Para la eliminación de impurezas se lavó el marlo de maíz con abundante agua destilada. Luego el biosorbente fue trasferido a un horno y secado a 60 °C por 24 horas. Las muestras secas fueron molidas y tamizadas con malla 70 μm . Una cantidad de esta biomasa (MZ) fue puesta en contacto con una solución de NaOH (0,2 M) por un espacio de 6 horas con agitación constante, posteriormente se lavó con abundante agua destilada hasta pH constante, finalmente se secó en un horno a 60 °C para obtener la biomasa modificada (MZM). Las soluciones de Pb (II) fueron preparadas disolviendo sal anhidra de nitrato de plomo, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Scharlau, Lead (II) grade ACS, 99,5%) en agua desionizada.

Caracterización del biosorbente

El área superficial se obtuvo mediante adsorción de N_2 (99,9% pureza) a 77 K en un equipo de adsorción Micromeritics, modelo Gemini VII (serie t). Para la determinación del área superficial y volumen de microporo se utilizaron las ecuaciones de BET (Brunauer- Emmett-Teller) y DR (Dubinin-Radushkevich). Los grupos funcionales en el biosorbente se estudiaron por espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR) en un espectrofotómetro SHIMADZU FTIR- 8700; para ello se empleó 0,002 gr de biosorbente y 0,2 gr de KBr, las muestras se homogenizaron y pulverizaron en un mortero de ágata y secadas por 48 h a 60 °C en un horno para luego ser analizadas en un rango espectral de 4000 a 400 cm^{-1} .

Ensayos de biosorción

La biosorción de los iones de Pb(II) de soluciones acuosas se llevó a cabo en un sistema batch, utilizando 100 mL de muestra de solución de Pb(II); los parámetros de velocidad de agitación (150 rpm) y temperatura (20 °C) se mantuvieron constantes.

Se estableció la dosis del biosorbente, utilizando cantidades diferentes del marlo de maíz (0,1; 0,2; 0,4 y 0,8 g) en 100 mL de la solución. Para determinar el equilibrio cinético, se trabajó a diferentes intervalos de tiempo en un rango de 1-180 min. El equilibrio de sorción se evaluó a diferentes concentraciones iniciales del adsorbato en un rango de 5-70 mg/L de Pb(II). El estudio de la influencia del pH se realizó ajustando pH de la solución inicial en un rango de 2-6 utilizando soluciones 0,1 M NaOH y HNO_3 . En cada uno de los casos luego del experimento, las fases se separaron por filtración utilizando papel filtro Wattman N° 40. La concentración final del plomo en la solución en equilibrio (C_e) se determinó por absorción atómica con un espectrofotómetro marca SHIMADZU modelo AAS 6800 a una longitud de onda de 283,3nm.

La cantidad de iones de plomo retenidos por el biosorbente (q_e , mg/g) y el porcentaje de biosorción se calcularon mediante las ecuaciones 01 y 02, respectivamente.

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)}{M} \times V \quad (01)$$

$$\%R = \frac{(C_0 - C_e)}{C_0} \times 100 \quad (02)$$

donde: C_0 y C_e son las concentraciones inicial y final de la solución de los iones de plomo (mg/L) antes y después de la biosorción, respectivamente, M es la masa del biosorbente (g), y V es el volumen de la solución (L).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del biosorbente

Análisis próximo. En la tabla 1 se muestran los resultados del análisis próximo del marlo de maíz modificado.

Tabla 1. Análisis próximo del marlo de maíz.

	% peso
Humedad	13,8
Material volátil	72,8
Cenizas	2,91
Carbón fijo	10,49

Análisis textural. El análisis de las propiedades texturales se realizó a través de la determinación y análisis de las isotermas de adsorción de N_2 en el sistema sólido-gas y utilizando las ecuaciones BET. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Caracterización textural del MZM

Área superficial BET (m^2/g)	2,1673
Diámetro de poro (nm)	8,05
Volumen mesoporo (cm^3/g)	$5,6 \times 10^{-5}$
Volumen total (cm^3/g)	0,02759

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). En la figura 1 se muestra el espectro del marlo de maíz modificado MZM, donde se reconocen los siguientes grupos: la banda ancha a $3303,8\text{ cm}^{-1}$, es atribuida a los grupos hidroxilos (-OH), la banda a $2924,9\text{ cm}^{-1}$ fue asignada a los alcanos ($-\text{CH}_2-$), los picos intensos a $1726,2$ y $1247,9\text{ cm}^{-1}$ son debidos a la vibración de tensión y flexión en el plano del grupo de los esteris ($=\text{C}-\text{O}-\text{C}$), la banda a $1620,8\text{ cm}^{-1}$ es característica del estiramiento asimétrico del doble enlace del carboxilo $\text{C}=\text{O}$, la banda a $1510,2\text{ cm}^{-1}$ es asignada al grupo de los aminos ($-\text{NH}-$), el pico a $1420,4\text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento vibracional del ácido carboxílico (COOH) y la banda a $1043,4\text{ cm}^{-1}$ fue asignada a los anhídridos. Todas las bandas mencionadas son características en materiales lignocelulósicos.⁷

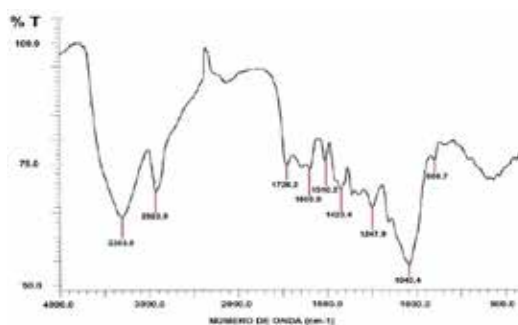


Figura 1. Espectro de FTIR del marlo de maíz modificado MZM

Biosorción de plomo

Efecto de la concentración del biosorbente. El efecto de la concentración del biosorbente fue estudiado usando 100 mL de una solución de Pb(II) y diferentes concentraciones del biosorbente. En la Figura 2 se observa el incremento del porcentaje de biosorción a medida que va aumentando la dosis del biosorbente.

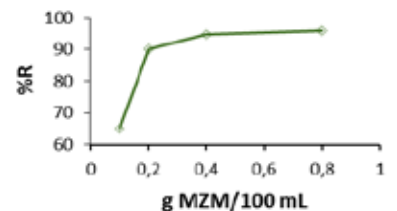


Figura 2. Relación de la concentración inicial del MZM con el porcentaje de remoción, $\text{pH} = 5$

Este incremento está relacionado al aumento del área de contacto del sólido adsorbente con el adsorbato, de esta manera va aumentando el número de los sitios de biosorción disponibles. Se observa también que un aumento de la concentración del biosorbente después de 4 g/L no provoca un cambio sustancial en el porcentaje de biosorción motivo por el cual la dosis que se usa en los ensayos próximos es de 4 g/L.

Isotermas de adsorción. Las isotermas de biosorción, representa la cantidad de Pb II (mg) retenido por el biosorbente (g) y describen la manera cómo interactúa el adsorbato con la superficie del material adsorbente.

La isoterma fue obtenida graficando la capacidad de adsorción (q_e) expresada en mg de Pb(II)/g de biomasa (MZM) versus la concentración del Pb(II) en equilibrio (C_e) y se muestran en la figura 3. En esta se observa que la curvatura inicial de la isoterma se va separando a medida que se incrementa el valor de C_e , lo que estaría indicando que las moléculas de Pb(II) tienen más dificultad para encontrar un sitio activo de adsorción. La capacidad de adsorción se incrementa hasta casi alcanzar una condición estable de 12,44 mg Pb(II)/g. Asimismo, se muestra la comparación de la isoterma de biomasa sin modificar (MZ) con la isoterma de la biomasa modificada (MZM) donde se observa que la capacidad de adsorción (q_e) se incrementa en aproximadamente un 40%, esto se atribuye al aumento de los sitios de adsorción después que la biomasa ha sido modificada.

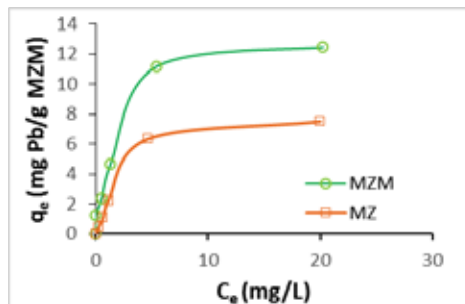


Figura 3. Isotermas para la adsorción de Pb (II) utilizando MZM y MZ, T=20oC, pH= 5

Correlación de los valores experimentales con los modelos de isotermas. Los datos experimentales fueron correlacionados con dos modelos de isotermas. El modelo de Langmuir asume una sorción del soluto en monocapa con una energía de sorción homogénea.⁸ Este modelo es expresado mediante la siguiente ecuación:

$$q_e = q_{\max} \frac{K_0 \cdot C_e}{1 + K_L C_e} \quad (03)$$

donde: q_e (mg/g) es la capacidad de sorción en el equilibrio y q_{max} (mg/g), es la capacidad de sorción en monocapa, K_L , es una constante que representa la afinidad entre el adsorbato y el adsorbente, C_e (mg/L), es la concentración del adsorbato en el equilibrio. Los valores de q_{max} , Q_0 y K_L se hallaron luego de graficar C_e/q_e versus C_e (figura 4A). El modelo de Freundlich es una expresión empírica que asume la sorción del soluto en multicapas, considerando que las energías de sorción son heterogéneas.⁹ El modelo de Freundlich es expresado mediante la ecuación 04.

$$q = K_F \cdot C_e^{1/n} \tag{04}$$

donde K_F (L/g) es una constante de la adsorción en equilibrio y n es una constante característica asociada al grado de favorabilidad de la adsorción. Estos valores se hallaron luego de graficar $\log q_e$ versus $\log C_e$ (figura 4B).

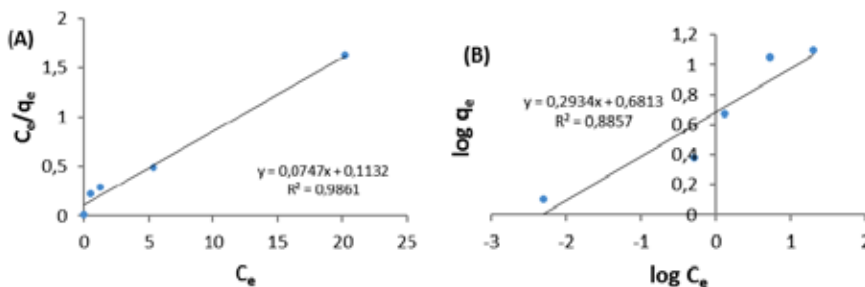


Figura 4. Correlación de los datos experimentales empleando (A) el modelo de Langmuir y (B) el modelo de Freundlich para la biomasa MZM.

En la tabla 3 se puede observar las constantes de ambos modelos hallados a partir de las ecuaciones linealizadas de las isothermas de la figura 4. Al examinar las correlaciones se observa que los valores experimentales se ajustan mejor al modelo de Langmuir, el cual explica una sorción en monocapa en centros activos energéticamente homogéneos. Para el modelo de Freundlich, según Kadaverlu¹⁰, los valores de n en un rango de $1 < n < 10$ indican una adsorción favorable del adsorbato sobre el adsorbente, el valor de 3,41 se encuentra dentro del rango, lo que indicaría que el ión Pb(II) se retiene favorablemente en la superficie de la biomasa MZM.

Tabla 3. Parámetros de los modelos de las isothermas de adsorción.

Constantes	Langmuir	Freundlich
$q_{max}(mg L^{-1})$	13,37	-
K_L	0,67	-
K_F	-	4,8
N	-	3,41
R^2	0,9861	0,8857

El modelo de Langmuir puede explicar la característica de la isoterma en términos del valor de R_L el cual es un parámetro de equilibrio definido por la ecuación 05.

$$R_L = \frac{1}{(1 + K_L C_e)} \quad (05)$$

Hall *et al.*¹¹ reportaron en sus investigaciones que el valor de R_L indica la forma de la isoterma donde si $0 < R_L < 1$ esta es favorable. La tabla 4 muestra los valores de R_L obtenidos de la adsorción de plomo. Se puede apreciar que los valores de R_L se encuentran en el rango en todos los casos, lo que indica que la isoterma es favorable y esa tendencia es mayor cuanto más pequeño sean los valores de R_L .

Tabla 4. Valores de R_L en la adsorción de Pb(II) sobre la biomasa MZM

C_0 (mgL ⁻¹)	R_L
5	0,2326
10	0,1316
20	0,0704
50	0,0294

Cinética de biosorción. El proceso de biosorción es dependiente del tiempo y es muy importante saber su comportamiento sobre todo para diseñar el reactor. La biosorción se da en dos etapas: la primera es la más rápida y se lleva a cabo en la superficie de la biomasa, la fase lenta ocurre por difusión del metal en la parte interna de la biomasa.¹² En la figura 5 se muestra el efecto del tiempo de contacto sobre capacidad de adsorción de Pb(II) sobre la biomasa MZM. Se observa que la biosorción es rápida durante los primeros cinco minutos como resultado de la disponibilidad de los sitios de adsorción en MZM, pero el equilibrio se alcanza aproximadamente en 90 minutos, resultados similares reportaron Barka *et al.*¹³

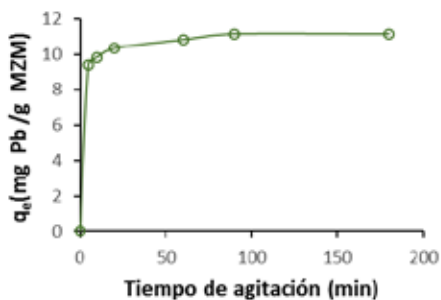


Figura 5. Cinética de biosorción del MZM, pH=5, $C_0 = 50$ mg/L

Correlación de los datos cinéticos. En el proceso de biosorción los parámetros cinéticos proporcionan importante información para el diseño y modelamiento del proceso. Los datos experimentales obtenidos fueron correlacionados en base a dos modelos diferentes: La ecuación de pseudo primer orden (ecuación de Lagergren) describe la adsorción en sistemas sólido-líquido, basado en la capacidad de sorción de los sólidos.¹³ Está dada mediante la siguiente ecuación:

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \tag{07}$$

donde: q_t y q_e (mg/g) en cualquier tiempo (t) y en el equilibrio (e) y k_1 es la constante de velocidad de primer orden (min^{-1}). Este modelo permite obtener la constante de velocidad de pseudo primer orden (k_1), considerando que la velocidad de adsorción depende únicamente de la concentración inicial del adsorbato. El modelo de pseudo segundo orden describe la cinética de quimisorción de soluciones líquidas y asume que los iones metálicos se adsorben en dos sitios distintos de sorción de la superficie adsorbente². Está dado por:

$$q_t = q_e \frac{k_2 \cdot t}{1 + k_2 \cdot t} \tag{08}$$

donde K_2 es la constante de velocidad de segundo orden (min^{-1}), y se utiliza para calcular la velocidad inicial h (mg/g min), determinada por:

$$h = k_2 \cdot q_e^2 \tag{09}$$

Los valores de las constantes de velocidad de los modelos cinéticos en la tabla 5. Al analizar los valores de R^2 se determinó que el modelo de pseudo segundo orden es el que mejor se ajusta a los datos experimentales lo que permite establecer que el proceso de adsorción de Pb(II) sobre la biomasa MZM está regida por una reacción de pseudo segundo orden.

Tabla 5. Constantes de los modelos cinéticos

Pseudo primer orden		Pseudo segundo orden		
K_1	R^2	K_2	h	R^2
min^{-1}		g/mg min	mg/g min	
0,029	0,9624	0,061	7,72	0,999

Efecto del pH. Se puede considerar que el pH de la solución es el parámetro más importante que influye en la capacidad de adsorción de metales pesados de un adsorbato sobre la superficie de la biomasa, ya que influye grandemente en las interacciones electrostáticas superficiales entre la biomasa y las diferentes especies químicas puestas en contacto.⁷ En la figura 6 se muestra la influencia del pH inicial de la solución sobre la remoción de Pb(II), a diferentes concentraciones iniciales del adsorbato. Para todas las concentraciones iniciales, está claro que, para valores bajos de pH la capacidad de remoción es bastante

baja. La capacidad de adsorción de Pb(II) se incrementa con el aumento del valor del pH, alcanzándose una máxima adsorción a pH 5. A valores mayores la capacidad de adsorción disminuye, no se realizaron ensayos a pH mayores que 6 ya que a partir de este valor el plomo empieza a precipitar. Este comportamiento se puede explicar debido a que la pared celular del MZM contiene una cadena de grupos funcionales de ácidos débiles, grupos OH y carboxílicos característicos de materiales lignocelulósicos (esto se puede corroborar con los resultados de FTIR presentados anteriormente). La biosorción se podría estar llevando a cabo debido a dos mecanismos: intercambio iónico e interacciones electrostáticas. A $\text{pH} < 5,0$ la especie dominante es el Pb(II) por lo que a valores bajos de pH disminuye la remoción, ya que se tiene una mayor cantidad de iones H_3O^+ los cuales estarían compitiendo con los iones de Pb(II) por los sitios de intercambio en el sistema y a la vez se da una fuerza de repulsión ya que la superficie se encontraría cargada positivamente. Conforme el pH se va incrementando, más grupos funcionales (carboxílicos e hidroxílicos) están disociados y se convierten en provechosos enlazantes de iones Pb(II) debido a que hay menos competencia de iones H^+ en la solución y por ende hay una fuerza de atracción entre el metal Pb(II) con la superficie del biosorbente. A pH mayores que 5,0, la especie dominante es $\text{Pb}(\text{OH})_2$ lo que favorece a la precipitación del Pb(II).¹⁴

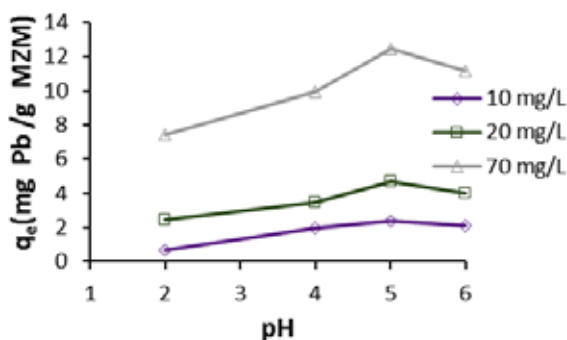


Figura 6. Efecto del pH en la biosorción de Pb(II), $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

CONCLUSIONES

- Se modificó la biomasa proveniente del marlo de maíz con una solución de NaOH logrando un biosorbente con buena capacidad de biosorción de plomo de hasta 12,44 mg Pb/g, lográndose mejorar la capacidad de adsorción en un 40% sobre su similar sin modificar (MZ).
- Se caracterizó el biosorbente MZM cuya área superficial es de 2,2 m^2/g y se determinó por FTIR la presencia de grupos funcionales como OH- y grupos carboxílicos los cuales estarían favoreciendo el proceso de biosorción, a través de mecanismo como la interacción electrostática e intercambio iónico entre el adsorbato y superficie del biosorbente.
- Se determinó las condiciones óptimas para la remoción de Pb(II) las cuales fueron de 4g/L de biosorbente, tiempo de agitación de 60 minutos y pH 5,0
- El modelo de las isotermas que tuvo mejor ajuste fue el de Langmuir el cual indica una

biosorción en monocapa con un capacidad máxima de saturación de 12,44 mg/g, y para la cinética el modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el de pseudo segundo orden.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo brindado para la elaboración de este trabajo de investigación, a la ingeniera Edith Solano del laboratorio de análisis instrumental de la Universidad Nacional del Centro del Perú. Asimismo, se hace extensivo el agradecimiento al doctor Gino Picasso del laboratorio de investigación de fisicoquímica, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Ingeniería por los análisis de área superficial realizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stanley E. Manahan. Environmental Chemistry. Eighth Edition. New York: CRC Press, 2005
2. García G, Colin A. Biosorption of lead by maize (*Zea mays*) stalk sponge. J Environ Manage. 2010; 91(11): 2079-2086
3. Hengpeng Y, Zhijuan Y. Adsorption of Pb(II) onto Modified Rice Bran. Nat Resour. 2010; 1:104-109.
4. dos Santos WNL, Cavalcante DD, da Silva EGP, das Virgens CF, Dias F de S. Biosorption of Pb(II) and Cd(II) ions by Agave sisalana (sisal fiber). Microchem J. 2011;97(2):269-73.
5. Ronda A, Calero M, Blázquez G, Pérez A, Martín-Lara MA. Optimization of the use of a biosorbent to remove heavy metals: Regeneration and reuse of exhausted biosorbent. J Taiwan Inst Chem Eng. 2015;51:109-18.
6. Villalobos E, Ramírez I, Aguilar N, Rubio H, Pinedo C, Vélez Sánchez C. Remoción de plomo en solución acuosa por la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*). Investigación y Ciencia. 2014; 62:5-10.
7. Taşar S, Kaya F, Özer A. Biosorption of lead(II) ions from aqueous solution by peanut shells: Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies. J Environ Chem Eng. 2014; 2
8. López-Mesas M, Navarrete ER, Carrillo F, Palet C. Bioseparation of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution using cork waste biomass. Modeling and optimization of the parameters of the biosorption step. Chem Eng J. 2011;174(1):9-17.
9. Tunalı Akar S, Arslan S, Alp T, Arslan D, Akar T. Biosorption potential of the waste biomaterial obtained from Cucumis melo for the removal of Pb²⁺ ions from aqueous media: Equilibrium, kinetic, thermodynamic and mechanism analysis. Chem Eng J. 2012;185-186:82-90.
10. Kadirvelu K, Thamaraiselvi K, Namasivayam C. Adsorption of nickel(II) from aqueous solution onto activated carbon prepared from coirpith. Sep Purif Technol. 2001;24(3):497-505.
11. Hall KR, Eagleton LC, Acrivos A, Vermeulen T. Pore- and solid-diffusion kinetics in

- fixed-bed adsorption under constant-pattern conditions. *Ind Eng Chem Res Fundam.* 1996; 5(2):212-219.
12. García-Rosales G, Colín-Cruz A. Biosorption of lead by maize (*Zea mays*) stalk sponge. *J Environ Manage.* 2010;91(11):2079-86.
 13. 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(3):144-9.
 14. Boparai HK, Joseph M, O'Carroll DM. Kinetics and thermodynamics of cadmium ion removal by adsorption onto nano zerovalent iron particles. *Journal of Hazardous Materials.* 15 de febrero de 2011;186(1):458-65.
 15. Sekar M, Sakthi V, Rengaraj S. Kinetics and equilibrium adsorption study of lead(II) onto activated carbon prepared from coconut shell. *J Colloid Interface Sci.* 2004;279(2):307-13.

CALIFICACIÓN DE LA EQUIVALENCIA FARMACÉUTICA *in vitro* POR LA METODOLOGÍA HPLC DE CUATRO MEDICAMENTOS CONTENIENDO PARACETAMOL, CLORFENAMINA MALEATO Y FENILEFRINA CLORHIDRATO EN TABLETAS

JhonneL Samaniego Joaquin^a, Gladys Arias Arroyo^a

RESUMEN

Se calificó la equivalencia farmacéutica *in vitro* de cuatro medicamentos conteniendo paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas utilizando la Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa (HPLC-RP), se determinó los perfiles de disolución del producto de referencia y de los 4 productos en estudio, además se establecieron y compararon las diferencias de los perfiles de disolución del producto de referencia y los productos en estudio. El diseño de la metodología empleada fue analítico, experimental y comparativo. Se evaluaron cuatro formulaciones comercializadas en Lima y el medicamento de referencia mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se cuantificaron los perfiles de disolución y fueron comparados a través de un método estadístico modelo independiente, factor de diferencia (f_1) y de similitud (f_2), los cuales revelaron que las curvas de disolución son distintas entre los productos del laboratorio de referencia y los laboratorios analizados, ya que f_1 y f_2 estuvieron fuera de los rangos establecidos en dos de las cuatro formulaciones evaluadas. Los resultados obtenidos demostraron que dos de los cuatro productos analizados con este método no serían equivalentes farmacéuticos.

Palabras clave: Equivalencia farmacéutica *in vitro*, cromatografía líquida de alta resolución, perfiles de disolución, factor de diferencia (f_1), factor de similitud (f_2).

RATING PHARMACEUTICAL EQUIVALENCE *in vitro* BY HPLC METHODOLOGY FOUR DRUGS CONTAINING ACETAMINOPHEN, CHLORPHENIRAMINE MALEATE AND PHENYLEPHRINE HYDROCHLORIDE TABLETS

ABSTRACT

Pharmaceutical equivalence *in vitro* four medicines containing paracetamol, maleate chlorpheniramine and phenylephrine hydrochloride tablets using Chromatography Liquid High Resolution reversed phase (HPLC-RP) is called, the dissolution profiles of the reference product and were determined 4 products in the study also were established and compared the

^a Facultad Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Jr. Puno 1002. Jardín Botánico.
Lima. Perú. jhonneL28@hotmail.com

differences in the dissolution profiles of the reference product and the products under study. The design methodology was analytical, experimental and comparative. Four formulations marketed in Lima and the reference product was evaluated by the method of high performance liquid chromatography (HPLC). The dissolution profiles were measured and were compared using a statistical method independent model difference factor (f_1) and similarity (f_2), which revealed that the dissolution curves are different between products reference laboratory and laboratories analyzed, since f_1 and f_2 were outside the ranges established in two of the four formulations tested. The results showed that two of the four products tested by this method would not be pharmaceutical equivalents.

Key words: *in vitro* pharmaceutical equivalence, high-resolution liquid chromatography, dissolution profiles difference factor (f_1), similarity factor (f_2).

INTRODUCCIÓN

Los estudios de bioequivalencia *in vivo* han constituido el tipo de evidencia de primera elección para demostrar la intercambiabilidad de la mayoría de los medicamentos. Sin embargo, entidades internacionales como la FDA (Food and Drug Administration) y la EMA (European Medicines Agency) han abierto la puerta a la posibilidad de demostrar la equivalencia *in vitro* para ciertos medicamentos, mediante ensayos de disolución y pruebas que garantizan su eficacia y seguridad; y así evitar la realización de ensayos *in vivo* en humanos y disminuir los costos de desarrollo de los medicamentos. Para ello utilizamos las comparaciones de los perfiles de disolución del medicamento en estudio.¹

Los medicamentos genéricos son todos aquellos diferentes al innovador. Equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas que pueden o no ser equivalentes terapéuticos. Aquellos que hayan demostrado equivalencia *in vivo* o *in vitro*, se consideran terapéuticamente equivalentes al producto de referencia y pueden ser declarados intercambiables. Son equivalentes farmacéuticos aquellos medicamentos que contienen la misma cantidad molar de ingrediente farmacéutico activo, en la misma forma farmacéutica, están destinados a ser administrados por la misma vía y cumplen con estándares de calidad idénticos o comparables.¹

Los estudios *in vitro* están constituidos por estudios comparativos de perfiles de disolución, en donde se determina la cantidad o porcentaje del principio activo disuelta en función del tiempo bajo condiciones controladas y validadas. El propósito de este tipo de estudio es comparar las características de liberación del principio activo contenido en una forma farmacéutica sólida oral de liberación inmediata.²

Las pruebas para realizar los perfiles de disolución deberán realizarse tomando como referencia la metodología establecida en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) en un Aparato I a 100 rpm o un Aparato II a 50 rpm usando 900 mL de los siguientes medios de disolución: (1) 0,1 N de HCl o Fluido Gástrico Simulado USP sin enzimas; (2) un tampón de pH 4,5 y (3) un tampón de pH 6,8 o Fluido Intestinal Simulado USP sin enzimas. Para cápsulas y comprimidos recubiertos de gelatina, se puede usar Fluidos Gástrico o Intestinal

Simulado USP (con enzimas). Se deberá evaluar un mínimo de 12 unidades posológicas de un producto medicamentoso para respaldar una solicitud de bioexención. Se deberá recolectar las muestras en un número suficiente de intervalos para caracterizar el perfil de disolución del producto medicamentoso. Cuando se comparan los productos de prueba y referencia, se deberá comparar los perfiles de disolución usando un factor de similitud (f_2). El factor de similitud es una transformación logarítmica de la raíz cuadrada recíproca de la suma del error cuadrado y es una medición de la similitud en el porcentaje (%) de disolución entre las dos curvas.³

La cuantificación simultánea de las muestras obtenidas de la combinación de paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato como medicamento antigripal en tabletas, se determinó por el método analítico HPLC ya que es más específico y sensible.⁴

El objetivo general del presente trabajo fue calificar la equivalencia farmacéutica *in vitro* de cuatro medicamentos conteniendo paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas utilizando la Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa (HPLC-RP).

Los objetivos específicos fueron la determinación de los perfiles de disolución del producto de referencia y de los 4 productos en estudio, además comparar las diferencias de los perfiles de disolución del producto de referencia y los productos en estudio.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

Ácido clorhídrico (Merck), fosfato monobásico de potasio (Merck), acetonitrilo (grado HPLC, J.T. Baker), ácido fosfórico al 85% (calidad R.A. J.T. Baker), agua (HPLC).

Material de referencia

Clorfeniramina maleato (estándar primario USP), Paracetamol (estándar primario USP) y Fenilefrina clorhidrato (estándar primario USP),

Equipos

- Sistema HPLC Agilent Technologies 1260, equipado con bomba 1260-G1311B, auto muestreador 1260 ALS-G1329B, horno para columna 1260 TCC-G1316A y detector de arreglo de diodos 1260 DAD-G4212B. Para la adquisición y procesamiento de los cromatogramas, se empleó el programa Open lab.
- Equipo de disolución Sotax AT7 Smart
- Balanza analítica Mettler Toledo XPE205

Sistema cromatográfico

Se empleó como fase móvil una solución fosfato monobásico de potasio, se ajustó a pH 3,5 con ácido fosfórico al 85%. Se empleó una columna L11 relleno de grupos fenilo de sílice de 150 x 4,6 mm 5 μ m (Agilent). Se trabajó a un flujo de 0,5 mL/min hasta el minuto 7,0 y luego

se aumentó el flujo a 1,0 mL/min hasta el minuto 22,0 de forma constante hasta el minuto 35,0 y luego se disminuye el flujo a 0,5 mL/min hasta el minuto 40,0. También cuenta con una elución en gradiente de acetonitrilo a los 22,0 minutos en un 20% hasta el minuto 35,0 y luego continuo con fase móvil. Se empleó detección UV a 205 nm para Clorfeniramina maleato, 202 nm para Fenilefrina clorhidrato, 298 nm para Paracetamol; temperatura de la columna 30°C; volumen de inyección: 20µL.

Método

Se utilizó el método de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP) en fase reversa para determinar la equivalencia *in vitro* de la combinación de paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato tabletas.⁴

Tipo y diseño de investigación

Estudio analítico experimental y comparativo, empleándose cuatro formulaciones de la combinación de paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato tabletas comercializados en la ciudad de Lima, en establecimientos farmacéuticos los cuales serán comparados con el original de laboratorio multinacional (medicamento de referencia).

Unidad de análisis

Se procedió a validar un método de ensayo por HPLC para determinar la equivalencia *in vitro* de la combinación de paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato tabletas.

Tamaño de muestra

Cinco en total: cuatro formulaciones comercializadas en Lima y el medicamento de referencia. Para calificar la equivalencia farmacéutica *in vitro* se comparó simultáneamente cada uno de los medicamentos en estudio con el producto de referencia.

Selección de muestra

Se procedió a obtener las muestras de las cuatro formulaciones, adquiriéndolas en cuatro cadenas de boticas y farmacias de mayor influencia en el mercado farmacéutico que son comercializadas en la ciudad de Lima.

Técnica de recolección de datos

Los perfiles de disolución fueron cuantificadas a través de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP). Estos perfiles se compararon a través de un método estadístico modelo independiente, factor de diferencia (f1) y de similitud (f2).³

Determinación de los perfiles de disolución:

- **Preparación de la solución estándar**

Se pesaron 46,5 mg de Fenilefrina clorhidrato y 18,5 mg de Clorfeniramina maleato, se transfirieron a un matraz volumétrico de 250 mL. Se añadieron 100 mL fase móvil y se sónico por 5 minutos y se enrasó con fase móvil. (Fiola A). Se pesaron 55,0 mg de paracetamol y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL. Se añadieron 50 mL

de fase móvil y se sónico por 5 minutos. Se transfirió 3 mL de la Fiola A y se enrasó con fase móvil. Se homogeneizó y filtró por membrana de 0,45µm PVDF Millipore. Concentración aproximada de 0,0056 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, 0,0022 mg/mL de clorfeniramina maleato y 0,55 mg/mL de paracetamol.

- Preparación de las muestras

Se evaluaron doce tabletas de cada formulación por lote y en todos los procesos, de igual concentración nominal de 5 mg de fenilefrina clorhidrato, 5 mg de clorfeniramina maleato y 500 mg de paracetamol para todas las muestras. El volumen de medio de disolución a emplear fue de 900 mL al que se le agrego las formulaciones en estudio y se muestrearon de manera manual y con 5 tiempos de muestreo recomendados por la FDA establecidos a los 15, 30, 45, 60 y 75 minutos. Los perfiles de disolución se realizaron usando aparato 2 USP a 50 rpm empleando equipo de disolución ZOTAX. Los medios de disolución fueron soluciones amortiguadoras USP (11) para simular los fluidos fisiológicos del sistema gastrointestinal: pH 1,2 (fluido gástrico simulado sin enzimas), pH 4,5 (solución buffer acetato), y pH 6,8 (solución buffer fosfato) a una temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Todas las muestras se filtraron a través de membranas de 0,45 µm PVDF Millipore. Concentración aproximada de 0,0056 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, 0,0056 mg/mL de clorfeniramina maleato y 0,55 mg/mL de paracetamol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Comparación de los perfiles de disolución para las cuatro formulaciones en estudio y el producto de referencia en medio de disolución a pH 1,2

Tabla 1. Porcentaje promedio liberado de fenilefrina clorhidrato en medio de disolución pH 1,2; resultado f1 y f2.

REFERENCIA	84,85%	93,67%	94,54%	95,45%	96,51%
PRODUCTO A	75,51%	82,39%	87,51%	88,86%	90,60%
f1 = 8,63			f2 = 53,96		
PRODUCTO B	46,74%	51,91%	53,44%	54,87%	56,99%
f1 = 43,24			f2 = 19,77		
PRODUCTO C	42,72%	49,96%	51,44%	52,66%	53,64%
f1 = 46,15			f2 = 18,36		
PRODUCTO D	76,21%	80,50%	82,36%	89,64%	92,22%
f1 = 9,48			f2 = 51,06		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)

Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

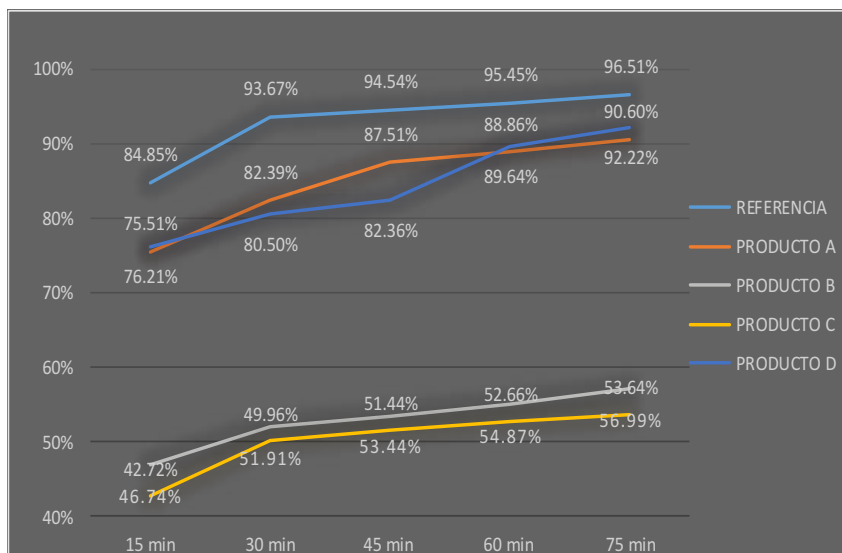


Figura 1. Comparación de los perfiles de disolución de fenilefrina clorhidrato en medio a pH 1,2.

Tabla 2. Porcentaje promedio liberado de clorfenamina maleato en medio de disolución pH 1,2; resultado f1 y f2.

	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min
REFERENCIA	86,40%	95,47%	96,61%	97,62%	99,29%
PRODUCTO A	76,91%	84,05%	88,64%	91,13%	92,54%
f1 = 8,86			f2 = 53,08		
PRODUCTO B	48,63%	52,29%	55,63%	57,80%	60,27%
f1 = 42,23			f2 = 19,78		
PRODUCTO C	44,63%	51,95%	53,80%	55,07%	56,07%
f1 = 44,99			f2 = 18,43		
PRODUCTO D	77,46%	81,83%	84,06%	90,90%	95,24%
f1 = 9,66			f2 = 50,22		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)

Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

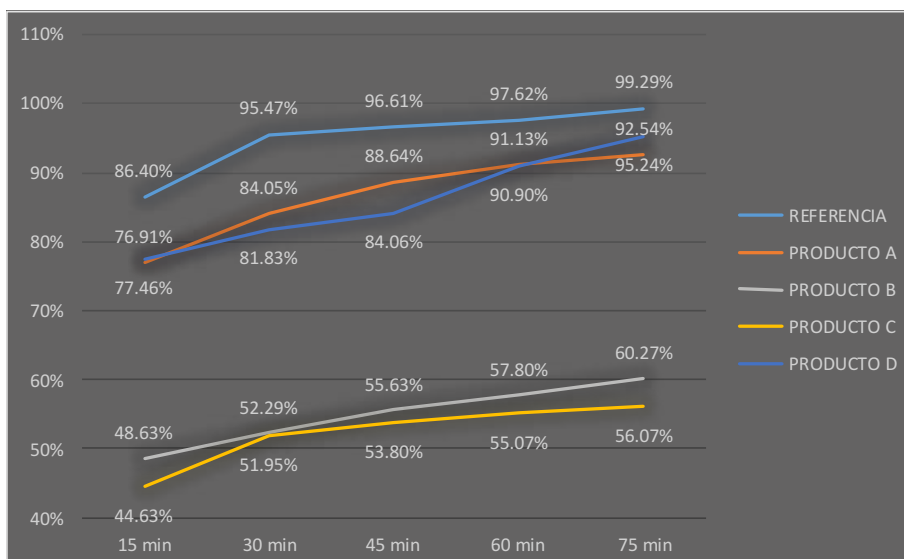


Figura 2. Comparación de los perfiles de disolución de clorfenamina maleato en medio a pH 1,2.

Tabla 3. Porcentaje promedio liberado de paracetamol en medio de disolución pH 1,2; resultado f1 y f2.

	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min
REFERENCIA	86,01%	95,89%	98,44%	99,58%	101,11%
PRODUCTO A	74,59%	85,68%	89,03%	92,16%	95,27%
f1 = 9,21			f2 = 51,96		
PRODUCTO B	46,03%	51,23%	53,92%	55,89%	58,59%
f1 = 44,77			f2 = 18,27		
PRODUCTO C	42,68%	49,21%	51,44%	53,20%	54,61%
f1 = 47,79			f2 = 16,86		
PRODUCTO D	75,26%	83,71%	86,97%	92,11%	95,24%
f1 = 9,93			f2 = 50,20		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)
 Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

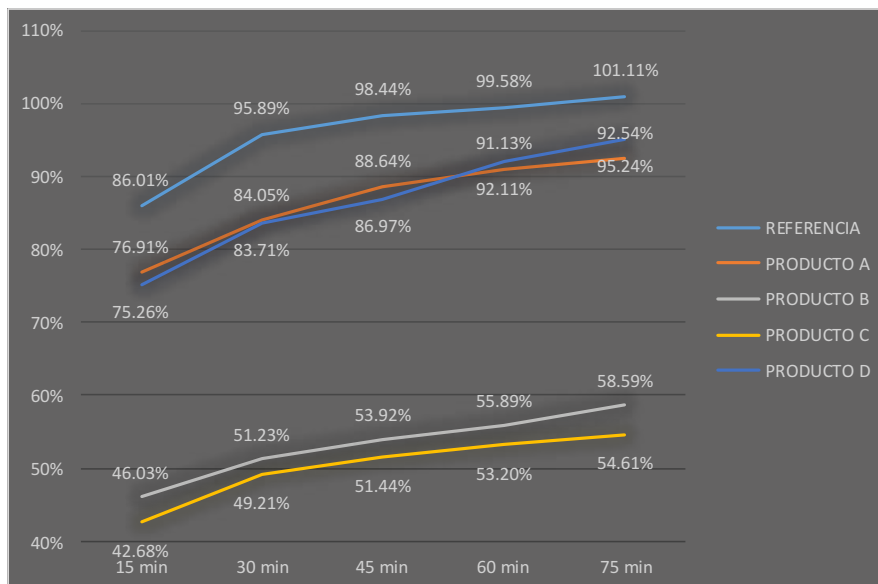


Figura 3. Comparación de los perfiles de disolución de paracetamol en medio a pH 1,2.

b. Comparación de los perfiles de disolución para las cuatro formulaciones en estudio y el producto de referencia en medio de disolución a pH 4,5.

Tabla 4. Porcentaje promedio liberado de fenilefrina clorhidrato en medio pH 4,5; resultado f1 y f2.

	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min
REFERENCIA	82,82%	92,99%	93,52%	93,98%	94,52%
PRODUCTO A	76,37%	87,23%	88,43%	89,42%	91,82%
f1 = 5,36			f2 = 64,32		
PRODUCTO B	47,30%	49,00%	50,08%	51,51%	52,96%
f1 = 45,21			f2 = 19,09		
PRODUCTO C	42,44%	48,58%	49,81%	51,32%	52,29%
f1 = 46,61			f2 = 18,47		
PRODUCTO D	78,05%	87,47%	88,50%	90,08%	91,27%
f1 = 4,91			f2 = 66,51		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)
 Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

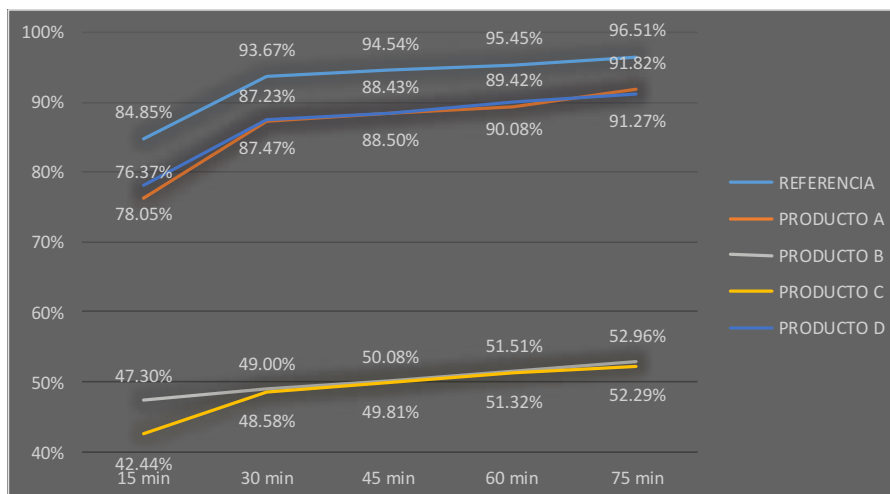


Figura 4. Comparación de los perfiles de disolución de fenilefrina clorhidrato en medio pH 4,5.

Tabla 5. Porcentaje promedio liberado de clorfenamina maleato en medio pH 4,5; resultado f1 y f2.

	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min
REFERENCIA	80,71%	91,40%	92,42%	93,22%	93,86%
PRODUCTO A	74,30%	85,35%	86,94%	87,20%	90,35%
f1 = 6,08			f2 = 62,29		
PRODUCTO B	45,07%	47,40%	48,80%	50,11%	51,19%
f1 = 46,29			f2 = 18,87		
PRODUCTO C	40,19%	46,57%	48,38%	49,76%	50,88%
f1 = 47,79			f2 = 18,22		
PRODUCTO D	76,92%	86,50%	87,53%	88,94%	90,77%
f1 = 4,64			f2 = 68,01		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)

Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

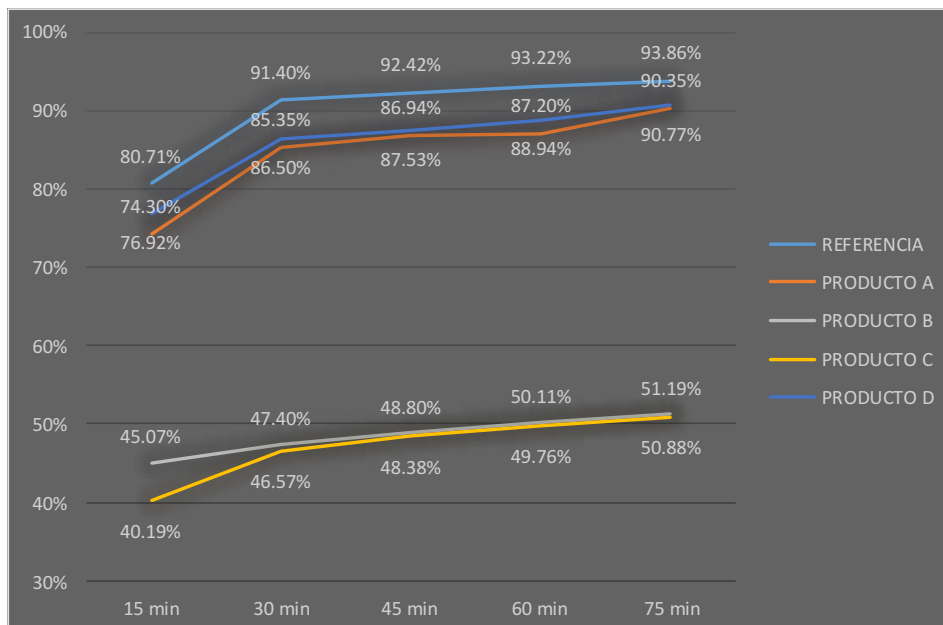


Figura 5. Comparación de los perfiles de disolución de paracetamol en medio a pH 1,2.

Tabla 6. Porcentaje promedio liberado de paracetamol en medio pH 4,5; resultado f1 y f2.

	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min
REFERENCIA	84,68%	92,93%	95,38%	97,76%	100,26%
PRODUCTO A	78,66%	88,11%	92,80%	95,08%	97,07%
f1 = 4,09			f2 = 68,81		
PRODUCTO B	56,76%	61,02%	64,85%	67,07%	69,90%
f1 = 32,15			f2 = 25,91		
PRODUCTO C	53,47%	56,97%	58,93%	61,45%	64,28%
f1 = 37,35			f2 = 22,64		
PRODUCTO D	80,23%	89,40%	91,06%	92,81%	95,07%
f1 = 4,76			f2 = 66,70		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)
 Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

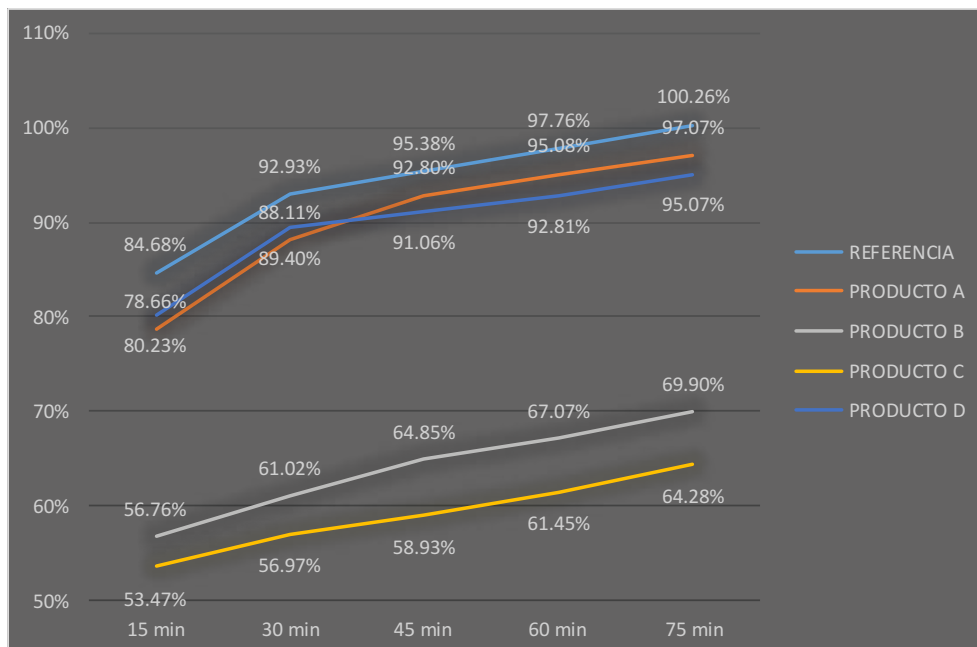


Figura 6. Comparación de los perfiles de disolución de paracetamol en medio pH 4,5.

c. Comparación de los perfiles de disolución para las cuatro formulaciones en estudio y el producto de referencia en medio de disolución a pH 6,8.

Tabla 7. Porcentaje promedio liberado de fenilefrina clorhidrato en medio pH 6,8; resultado f1 y f2.

	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min
REFERENCIA	82,82%	92,99%	93,52%	93,98%	94,52%
PRODUCTO A	82,46%	87,31%	88,44%	89,99%	91,99%
f1 = 3,85			f2 = 69,18		
PRODUCTO B	75,46%	76,25%	77,16%	78,26%	79,21%
f1 = 15,61			f2 = 41,56		
PRODUCTO C	73,11%	74,75%	75,98%	77,40%	78,37%
f1 = 17,08			f2 = 39,83		
PRODUCTO D	83,05%	84,63%	85,67%	87,08%	92,69%
f1 = 5,50			f2 = 60,65		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)
 Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

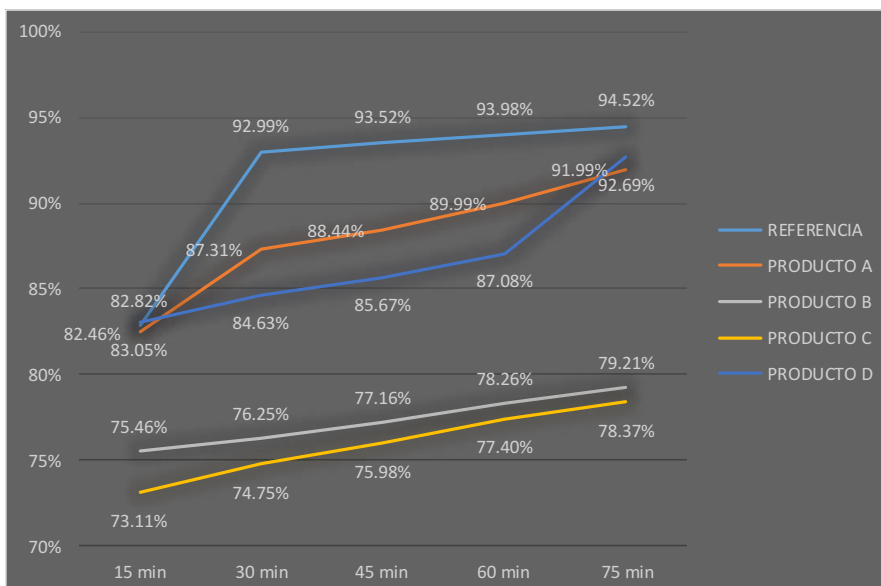


Figura 7. Comparación de los perfiles de disolución de fenilefrina clorhidrato en medio pH 6,8.

Tabla 8. Porcentaje promedio liberado de clorfenamina maleato en medio pH 6,8; resultado f_1 y f_2 .

	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min
REFERENCIA	82,82%	92,99%	93,52%	93,98%	94,52%
PRODUCTO A	82,46%	87,31%	88,44%	89,99%	91,99%
$f_1 = 3,85$			$f_2 = 69,18$		
PRODUCTO B	75,46%	76,25%	77,16%	78,26%	79,21%
$f_1 = 15,61$			$f_2 = 41,56$		
PRODUCTO C	73,11%	74,75%	75,98%	77,40%	78,37%
$f_1 = 17,08$			$f_2 = 39,83$		
PRODUCTO D	83,05%	84,63%	85,67%	87,08%	92,69%
$f_1 = 5,50$			$f_2 = 60,65$		

Factor de diferencia (f_1) = Rango de aceptación (0-15)

Factor de similitud (f_2) = Rango de aceptación (50-100)

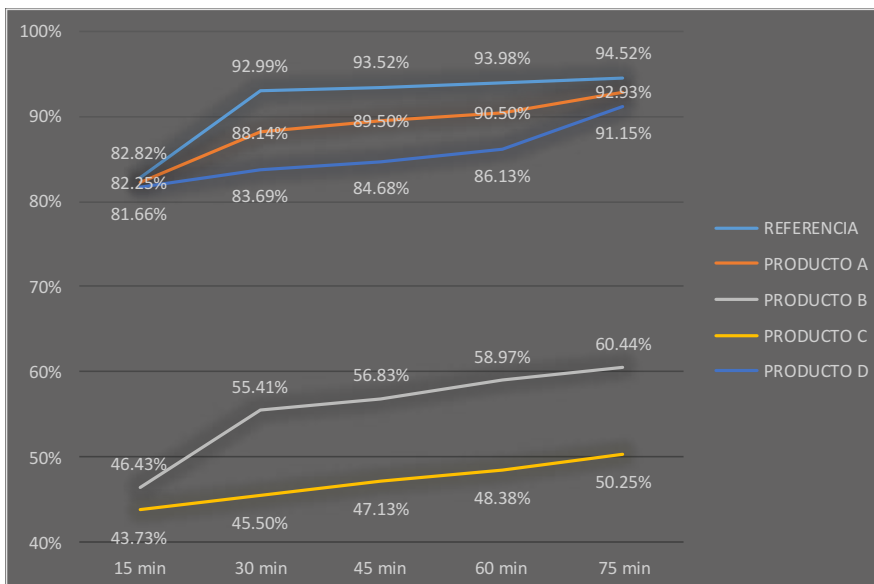


Figura 8. Comparación de los perfiles de disolución de clorfenamina maleato en medio pH 6,8.

Tabla 9. Porcentaje promedio liberado de paracetamol en medio pH 6,8; resultado f1 y f2.

	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min
REFERENCIA	84,23%	95,52%	96,99%	98,21%	100,35%
PRODUCTO A	81,31%	88,91%	90,48%	93,10%	95,32%
f1 = 5,50			f2 = 63,01		
PRODUCTO B	73,77%	79,90%	82,19%	83,42%	83,92%
f1 = 15,17			f2 = 41,78		
PRODUCTO C	77,69%	78,84%	79,86%	80,79%	81,66%
f1 = 16,09			f2 = 39,86		
PRODUCTO D	82,95%	84,76%	85,97%	87,32%	94,29%
f1 = 8,42			f2 = 52,45		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)
 Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

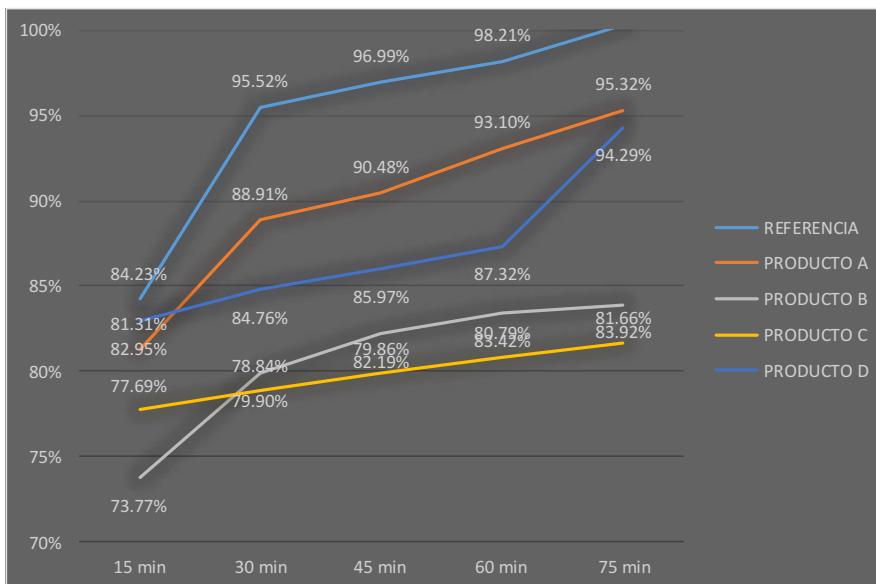


Figura 9. Comparación de los perfiles de disolución de paracetamol en medio pH 6,8.

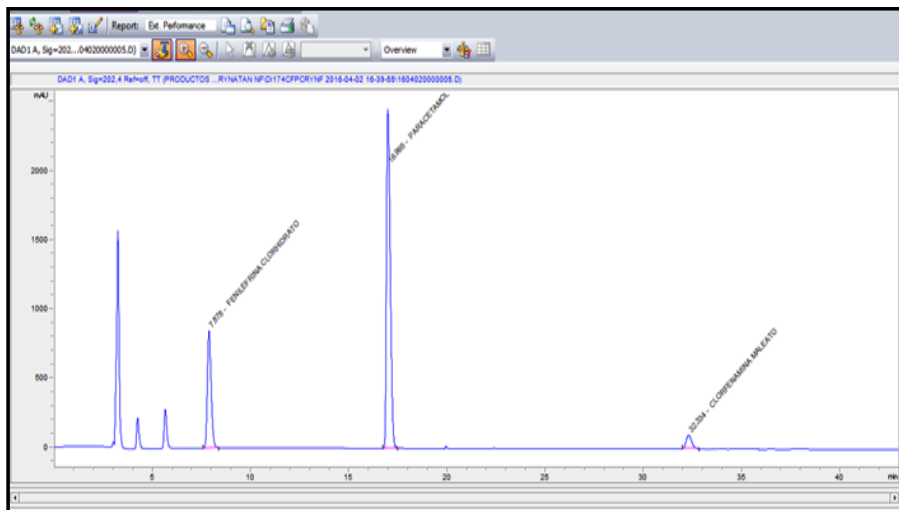


Figura 10. Cromatograma para cuantificar fenilefrina clorhidrato, paracetamol y clorfeniramina maleato

DISCUSIÓN

En el desarrollo de los perfiles de disolución según las tablas 1, 2 y 3, las formulaciones B y C, evidenciaron una baja disolución en medio de disolución a pH 1,2 en comparación con las formulaciones A y D también evaluadas las cuales sí resultaron ser similares al compararlas con el producto de referencia, según los datos obtenidos como el factor de similitud (f_2) y factor de diferencia (f_1).³

En las tablas 4, 5 y 6, las formulaciones A y D, lograron una mejor disolución en medio de disolución a pH 4,5 obteniendo factores de similitud (f_2) y factores de diferencia (f_1) aceptables, en comparación a las formulaciones B y C que no alcanzaron el mínimo requerido para ambos factores; determinando según este modelo que no son similares al producto de referencia.³

Las determinaciones de los perfiles de disolución de las formulaciones en estudio C y D en medio de disolución a pH 6,8, según tablas 7, 8 y 9, no lograron establecer su similitud con respecto al producto de referencia según la evaluación de los factores de similitud (f_2) y factores de diferencia (f_1); con respecto a las formulaciones A y D sí se obtuvieron valores aceptables, lográndose determinar su similitud según el análisis de los factores antes mencionados.³

Se observaron diferencias con respecto a la liberación de los principios activos entre el producto de referencia que liberó más del 80% a los 15 minutos en los tres diferentes medios a pH 1,2, 4,5 y 6,8 y las formulaciones en estudio que no tuvieron el mismo comportamiento logrando liberar en promedio más del 80% solo a los 30 minutos. Esta variación puede deberse a los diferentes excipientes empleados en la formulación de las diversas tabletas y el producto de referencia.⁸

CONCLUSIONES

Se utilizó una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa (HPLC-RP) para lograr determinar la equivalencia *in vitro* de la combinación de paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas; ya que presenta mayores ventajas por ser el principal método de separación de especies químicas estrechamente relacionadas.

Se logró desarrollar los perfiles de disolución de los de las cuatro formulaciones y el producto de referencia, los cuales fueron evaluados de acuerdo a un método modelo independiente f_1 y f_2 . Estos revelaron que dos formulaciones, B y C, no son equivalentes *in vitro*, ya que tienen un comportamiento diferente durante el desarrollo de los perfiles de disolución.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Salud Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas. Directiva Sanitaria que regula los estudios de Equivalencia Terapéutica para demostrar la intercambiabilidad de medicamentos. Lima, 2014
2. Medina A. Bioexenciones y estudios de bioequivalencia *in vitro*. [en línea] Revista electrónica del Centro de la Ciencia y la Investigación Farmacéutica. Colombia. 2009,5: 9-15. [accesado Febrero del 2009]. Disponible en: <http://www.clinicaces.com/userfiles//Magazine-CECIF-No%20-5-Feb-Mar-2009.pdf>
3. U.S. Food And Drug Administration. Exención de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia *in vivo* para formas posológicas orales sólidas de liberación inmediata en base a un sistema de clasificación de biofarmacéuticas. Guía para la Industria. Rockville: Food and Drug Administration; 2000.
4. Samaniego J, Arias G. Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación simultánea de fenilefrina clorhidrato, paracetamol, salicilamida, cafeína y clorfenamina maleato en tabletas. *Rev Soc Quim Perú*. 2016; 82.(2):196-207
5. Farmacopea de los Estados Unidos de América. USP 38 NF 33. Maryland: The United States Pharmacopeia Convention; 2015.
6. Herrera O, Grande M. Equivalencia terapéutica de tabletas de diazepam dispensadas en la ciudad de Ica, Perú. *Rev Med Hered*. 2012; 23(3):154-159.
7. Villalba O, Ortiz J, Grande M, Isasi J, Yantas D, Fiestas V. Estudio de Bioequivalencia de Ibuprofeno 400 mg. Tabletas. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2007; 24 (4):356-362.
8. European Medicines Agency (EMA). Committee for medicinal products for human use. Guideline on the Investigation of Bioequivalence. London: European Medicines Agency; 2010.

EVALUACIÓN DE OCRATOXINA A EN *Theobroma cacao* L. "CACAO BLANCO" DURANTE EL PROCESO DE COSECHA, FERMENTADO, SECADO Y ALMACENADO

Norma Ramos^a, Américo Castro^a, José Juárez^a, Otilia Acha de la Cruz^b, Nadia Rodríguez^b,
Jesús Blancas^b, Jackeline Escudero^a, Arnaldo Navarro^a.

RESUMEN

Se analizó la presencia de la ocratoxina A (OTA), una micotoxina con propiedades carcinogénicas, en el cacao blanco de Piura. Las muestras fueron colectadas en cuatro etapas de la producción de granos: cosecha, fermentado, secado y almacenado. El análisis se hizo tanto en la cáscara del grano como en el cotiledón. Las muestras fueron colectadas del centro de acopio de la Asociación de Pequeños Productores de Cacao de Piura (APPROCAP). La OTA se extrajo de las muestras utilizando bicarbonato de sodio 1%, se purificó mediante columnas de inmunofinidad y su posterior cuantificación por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR). En la etapa del fermentado se encontró una concentración detectable de OTA ($1,92 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{kg}$). Las etapas de cosecha, secado y almacenado en el proceso de producción de los granos de cacao no manifestaron presencia de OTA.

Palabras clave: Ocratoxina A (OTA), cacao blanco de Piura, columnas de inmunofinidad, cromatografía líquida de alto rendimiento.

OCHRATOXIN A EVALUATION IN *Theobroma cacao* L. "WHITE COCOA" DURING THE HARVESTING PROCESS, FERMENTED, DRIED AND STORED

ABSTRACT

The presence of ochratoxin A (OTA), a mycotoxin with carcinogenic properties, was analyzed in the white cocoa of Piura. Samples were collected in four stages of grain production: harvest, fermented, dried and stored. The analysis was done both on the grain shell and on the cotyledon. The samples were collected from the collection center of the Association of Small Producers of Cocoa Piura (APPROCAP). OTA was extracted from the samples using 1% sodium bicarbonate, purified by immunoaffinity columns and then quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). A detectable concentration of OTA ($1.92 \pm 0.02 \mu\text{g} / \text{kg}$) was found in the fermentation stage. The harvest, drying and storage stages in the cocoa grain production process did not show OTA.

Key words: Ochratoxin A (OTA), Cacao White Piura, immunoaffinity columns, High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

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

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

INTRODUCCIÓN

La ocratoxina A (OTA) es una toxina generada por hongos, especialmente del género *Aspergillus* y *Penicillium*, con propiedades nefrotóxicas, inmunotóxicas, teratogénicas y carcinogénicas; que ataca diversos cultivos, entre ellos el cacao¹.

El método ampliamente utilizado para el análisis de OTA, en diversas matrices, es la cromatografía líquida de alto rendimiento con detector de fluorescencia debido a su sensibilidad para detectar concentraciones inferiores a 1 µg/kg, y la cual ha demostrado ser eficiente en diversos tipos de muestras. Antes de cuantificar las muestras por cromatografía líquida de alto rendimiento, el contenido de OTA debe aislarse y extraerse. Si bien distintos métodos han sido utilizados para este fin, la extracción por cromatografía de inmunoafinidad es el método más difundido ya que ha demostrado mayor eficiencia. El método se basa en la propiedad que tienen ciertos anticuerpos para unirse específicamente a las moléculas de OTA mediante una reacción antígeno-anticuerpo. De esta forma, los anticuerpos presentes en la fase estacionaria de las columnas utilizadas en esta técnica pueden retener el contenido de OTA mientras dejan pasar los demás componentes de la muestra^{2,3}.

Trabajos acerca de la presencia de OTA en cacao se han realizado en Nigeria, Costa de Marfil, Guinea, Camerún, Italia, Brasil, entre otros. En estos trabajos se ha podido concluir que los organismos generadores de toxina están presentes desde la cosecha, siendo la etapa de fermentación del cacao donde proliferan en mayor cantidad. De igual modo, se ha demostrado que el secado del cacao y su almacenamiento en lugares secos, siempre que se realicen bien, disminuyen en gran magnitud la presencia de OTA⁴.

En el Perú no hay estudios profundos acerca de la incidencia de OTA en cacao, aun cuando hay una necesidad de estos para fijar un límite máximo⁵. Asimismo, no se cuenta con una norma de los niveles permitidos de OTA para el cacao y sus derivados; por ello, en este trabajo se planteó el análisis de la presencia de esta toxina en granos del “cacao blanco de Piura”, un tipo de cacao oriundo del Perú considerado de alta calidad. El análisis se realizó en las etapas de cosecha, fermentado, secado y almacenado del proceso de la producción del cacao, con el fin de determinar cómo la OTA se distribuye en la cáscara del grano, como en el cotiledón y detectar las etapas que requieren mayor cuidado durante el proceso. Este trabajo busca ser el primer paso de un estudio más profundo acerca de la incidencia de la Ocratoxina A en el cacao del Perú, así como de los métodos utilizados para su determinación.

PARTE EXPERIMENTAL

La investigación se realizó en el Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. Laboratorio de Investigación y Certificaciones (LABICER) de la Universidad Nacional de Ingeniería.

Reactivos

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) de grado analítico (Merck Peruana) 99%, estándar de ocratoxina A (OTA) 98% (Sigma Aldrich), metanol (MeOH) grado HPLC 99,9% (Scharlau), ácido acético (CH_3COOH) grado HPLC 98% (Merck Peruana), acetonitrilo (CH_3CN) grado HPLC 99,85% (Scharlau), buffer fosfato salino (PBS) en tabletas pH=7,40 (Sigma Aldrich). El agua utilizada fue purificada en un equipo Elga Purelab CLASSIC UV.

Equipos

Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento-SHIMADZU: desgasificador DGU-20A5R, automuestreador SIL-30AC, bomba cuaternaria LC-30AD, horno de columna: CTO-20AC, detector de fluorescencia RF-20AXs, control de sistema SBM-20A. Columna cromatográfica RP C18 de 250 mm x 4,6 mm ID x 5 μm partícula (Restek). Balanza analítica digital SARTORIUS CPA225D, equipo ultrasonido WISD Laboratory Instruments, equipo de agua ultrapura ELGA PURELAB CLASSIC UV, columnas de inmunoafinidad para ocratoxina OCHRAPREP.

Colecta de la muestra

Los granos de *Theobroma cacao* L. “cacao blanco” fueron colectados del centro de acopio de la Asociación de Pequeños Productores de Cacao de Piura (APPROCAP) localizado en el distrito de San Juan de Bigote, provincia de Morropón, Región Piura, Perú. Las actividades de muestreo se realizaron a una temperatura de 37°C y 70% de humedad atmosférica durante el mes de marzo del 2016. Las muestras se colectaron en distintas etapas del proceso de la producción del cacao, consistiendo en la cosecha y apertura del fruto de cacao, fermentado en cajas de fermentación durante seis días, secado al sol por otros seis días y para su almacenamiento y posterior venta. Se seleccionaron cuatro tipos de muestra: cacao recién cosechado (M1), granos de cacao fermentados (M2), granos de cacao secados (M3) y granos de cacao almacenados en sacos (M4).

Las muestras M1 se colectaron en forma de fruto a diferencias de las demás que se colectaron en forma de grano.

Pre-tratamiento de las muestras

De las muestras M1 se extrajeron los granos de los frutos y se secaron en estufa a 40°C por dos días; de igual forma, se secaron las muestras M2 que habían sido colectadas húmedas. Las muestras M3 y M4 se secaron por un día en estufa a 40°C, para eliminar la humedad que pudieron haber ganado durante su almacenamiento. Las muestras peladas, los cotiledones y las cáscaras se trataron en un mortero y luego en molino de cuchillas. Una vez trituradas se homogenizaron y se conservaron a 10°C para su análisis al día siguiente.

Preparación de los estándares de ocratoxina A

La solución stock de OTA y los estándares se prepararon utilizando una solución de trabajo con el fin de reproducir el solvente de las muestras, que consistió en una mezcla de metanol: ácido acético: agua (49:1:50). Se utilizó esta mezcla de solventes para reproducir la condición inicial de las mezcla de eluyentes elegida en base a las recomendaciones dadas por Tafuri *et*

al. (2004)⁶. La solución stock del estándar de OTA se preparó mediante la disolución de 1 mg de estándar puro en 100 mL del solvente de trabajo (10 ppm), un mililitro de esta solución stock se disolvió en 100 mL de solución de trabajo con el fin de obtener el stock de trabajo (100 ppb); a partir de este stock de trabajo se prepararon los diferentes estándares utilizados en la construcción de la curva de calibración que fueron: 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 y 10,0 ppm. El stock de trabajo fue preparado antes del análisis.

Extracción y purificación de la ocratoxina A

Este proceso se realizó por triplicado en cada uno de los cuatro grupos de muestra a analizar y, en cada una, se analizó tanto el cotiledón como la cáscara de la semilla. El método de acondicionamiento usado antes de colocar la muestra fue humedecer las columnas con agua grado HPLC y posteriormente con la solución PBS, de acuerdo con el método B descrito por Tafuri *et al.* (2004)⁶, 10 g de muestra a analizar se re-suspendieron en 200 mL de bicarbonato de sodio 1%, se homogenizó por tres minutos y se filtró por papel filtro Whatman N° 40; 20 mL del filtrado se adhirieron a 20 mL de buffer PBS a pH: 7,4; los 40 mL de esta solución se purificaron en la columna de inmunoafinidad y se eluyeron a velocidad de 1-2 gotas por segundo. La columna se lavó con 20 mL de agua y se eluyó el contenido de OTA con 1,5 mL de metanol (ácido acético al 2%) y 1,5 mL de agua.

Cuantificación por cromatografía líquida de alto rendimiento

Los análisis se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento con detección por fluorescencia siguiendo los parámetros recomendados por Tafuri *et al.* (2004)⁶.

La longitud de onda de excitación fue de 333 nm y la de emisión fue de 460 nm. La temperatura del horno de la columna fue de 25 °C. La elución fue a un flujo constante de 1 ml/min y $\text{CH}_3\text{CN}_{(\text{ácido acético } 1\%)} - \text{H}_2\text{O}_{(\text{ácido acético } 1\%)}$ (50:50 v/v) como el sistema de eluyentes inicial. El sistema inicial fue linealmente modificado a un CH_3CN 100% en 20 minutos. Después de 3 minutos de permanecer constante, el sistema fue restablecido linealmente a su condición inicial en 10 minutos, sumando un tiempo total de 33 minutos por análisis. Los eluyentes fueron preparados en el momento y filtrados (0,45 μm) antes de su uso.

Para la lectura de los estándares se realizaron tres inyecciones y dos para el análisis de las muestras. Todas las muestras se filtraron a través de filtro de jeringa (0,45 μm) antes de la inyección (20 μL) a la columna cromatográfica.

La identificación de la OTA se realizó utilizando el tiempo promedio de retención de las diluciones de trabajo. Este tiempo se obtuvo midiendo nueve veces el estándar de trabajo a una concentración de 5 ppb, procedimiento que también fue útil para obtener el límite de detección (LDD). El tiempo de retención promedio fue de 8,387 (RSD=0,302%) y el LDD fue de 0,194 ppb (RSD=4,978%). En la figura 1 se muestra el cromatograma de una de las corridas del stock de trabajo de 5 ppb.

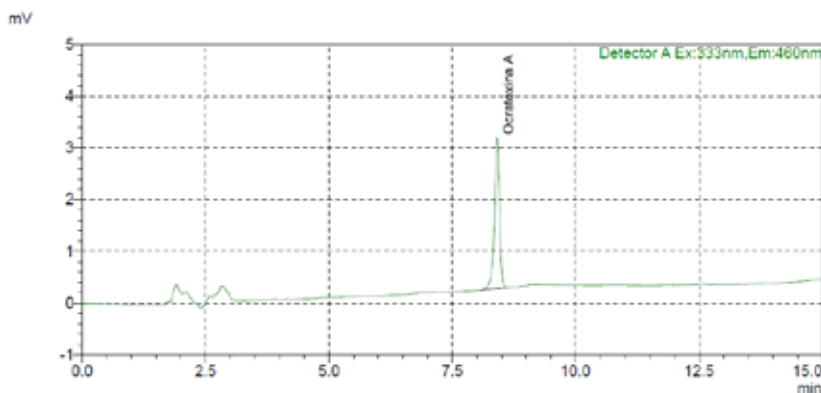


Figura 1. Cromatograma de una de las repeticiones del estándar de trabajo (5 ppb). El tiempo de retención fue de 8,412 s.

La cuantificación de la OTA se realizó comparando el área de los picos de las muestras analizadas y de los estándares de trabajo. En la figura 2 se observa la curva de calibración para 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 y 10,0 ppm la cual fue descrita en la preparación de los estándares de ocratoxina.

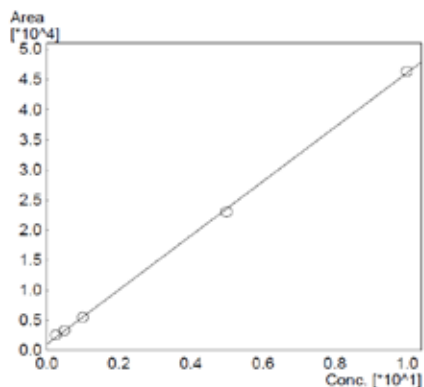


Figura 2. Curva de calibración utilizada para la cuantificación de la OTA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó el contenido de OTA en los procesos de cosecha (M1), fermentado (M2), secado (M3) y almacenado (M4) de cacao, tanto en la cáscara como en el cotiledón. De estos procesos, solo las muestras M2 presentaron niveles detectables de OTA. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en μg de OTA/kg de cacao con sus respectivas desviaciones estándar tal cual fueron calculadas utilizando el Excel Office 2010.

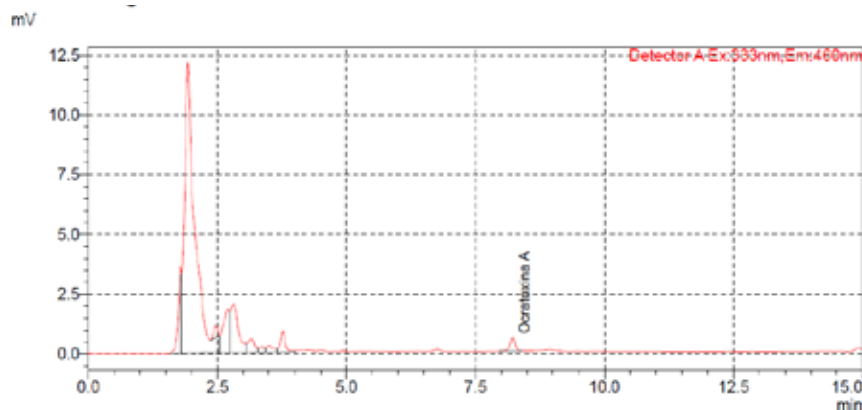
Tabla 1. Resultados de la cuantificación de OTA en las diferentes muestras.

Muestra	Proceso	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
M1 cotiledón	cosecha	<L.D.D
M1 cáscara	cosecha	<L.D.D
M2 cotiledón	fermentado	1.92 \pm 0.02
M2 cáscara	fermentado	<L.D.D
M3 cotiledón	secado	<L.D.D
M3 cáscara	secado	<L.D.D
M4 cotiledón	almacenado	<L.D.D
M4 cáscara	Almacenado	<L.D.D

L.D.D= Límite de detección.

El valor obtenido para la muestra M2 (cotiledón) es mayor que el límite sugerido por el gobierno de Italia (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), el cual es el único miembro de la Unión Europea que actualmente clama por el establecimiento de un límite legal para el cacao y derivados. Hasta la fecha, aún sigue en debate el establecimiento de un límite legal por parte del gobierno norteamericano. De igual forma, el Perú tampoco cuenta con un límite legal establecido.

El cromatograma de la muestra que presentó OTA (M2 cotiledón) se presenta en la figura 3. El cromatograma de una de las muestras en las cuales no se detectó OTA (M1 cotiledón) se muestra en la figura 4.

**Figura 3.** Cromatograma de la muestra M2 – cotiledón.

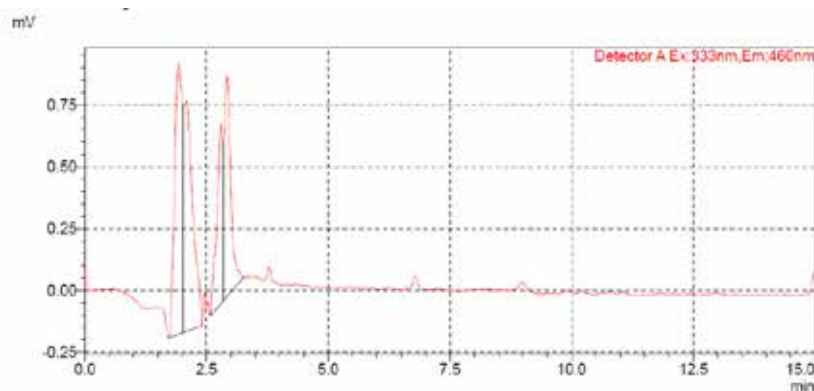


Figura 4. Cromatograma de la muestra M1 – cotiledón.

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento de granos de cacao muestra cierta deficiencia en la etapa del fermentado. Estos resultados se corresponden con los encontrados anteriormente en otras investigaciones, las cuales han demostrado que la mayor concentración de hongos productores de OTA (principalmente del género *Aspergillus*) se encuentra en la etapa final de la fermentación⁷.

La ausencia de OTA en los granos sin abrir se debe a que los hongos generadores de dicha toxina no penetran en el fruto, a menos que este haya sufrido daños físicos o infectado por otros agentes patógenos, caso en el cual se han reportado altas concentraciones de OTA⁷.

Una vez que los granos se abren, la presencia de diversos microorganismos comienza inmediatamente. Estos microorganismos provienen de fuentes como el medio ambiente, la mano de los agricultores, los instrumentos que se utilizan para cortar los frutos de cacao, entre otros². Los primeros microorganismos en presentarse en los granos son las levaduras fermentativas, pero luego son superadas por las bacterias generadoras de ácido acético y ácido láctico y, ocasionalmente, los hongos filamentosos generadores de toxinas. La proliferación de estos hongos se ve favorecida por el alto contenido de humedad de los granos (55%), la cual penetra en ellos y los hincha. Este hinchamiento también reduce la acidez de los granos que es un factor inhibitorio del crecimiento de los hongos filamentosos. Este hinchamiento interno que permite la penetración de los hongos explica por qué en esta etapa la OTA se encontró en la parte interna del grano⁸.

El haber encontrado OTA en solo una de las tres muestras extraídas en la etapa de fermentación, demuestra lo heterogéneo de la forma en que la OTA se reparte.⁵ Copetti *et al*⁹ analizaron la presencia de OTA en muestras de cacao de Brasil y encontró que menos del 5% del cacao fermentado estaba infectado y que este cacao se encontraba en su gran mayoría en la superficie; por lo que los resultados encontrados en el cacao de Piura evidencian la necesidad de mejorar la forma en que los cajones de fermentación se protegen del medio ambiente. Cabe mencionar que otro factor que influye la presencia de OTA, en el cacao, es la pulpa en los cajones ya que una mayor cantidad de ella ayuda a crear una barrera física contra la penetración de los microorganismos productores de toxinas¹⁰.

La cantidad de hongos generadores de OTA es menor en la etapa del secado, debido a que este proceso disminuye la actividad acuosa y la humedad desde 55 hasta 7%⁸. Con el fin de prevenir la presencia de microorganismos productores de toxinas se recomienda el secado directo al sol, ya que la radiación directa afecta la producción de OTA por parte de los microorganismos⁴. Otro factor que explica que no se haya detectado OTA, en esta etapa de la producción, es el hecho de que los agricultores del centro de acopio de APPROCAP retiran los granos que no presentan buen estado. Esta práctica ayuda a evitar la posible contaminación cruzada entre granos.

Es sabido que otra etapa crítica en la producción de OTA es el almacenaje. La cáscara del grano de cacao es higroscópica por lo que los granos deben almacenarse protegidos de la humedad⁴. En el caso del centro de acopio de APPROCAP, los granos de cacao de diferentes orígenes se almacenan en sacos de yute en forma separada y sobre parihuelas dejando poco aire en el interior de los sacos. Tal como indican los resultados, esta práctica es exitosa en su objetivo de evitar la proliferación de la toxina.

Los resultados obtenidos evidencian la necesidad de mejorar la forma en que las cajas de fermentación sean protegidas del medio ambiente en el centro de acopio de APPROCAP. Estos resultados se corresponden con estudios anteriores que demuestran que es en esta etapa donde principalmente proliferan los hongos productores de toxina. Las otras etapas de producción de granos de cacao: cosecha, secado y almacenado, no mostraron concentraciones de OTA detectables. Con el fin profundizar en los resultados obtenidos por este estudio se recomienda continuar con los análisis en otras temporadas de cosecha, además de utilizar nuevos métodos de cuantificación y compararlos.

CONCLUSIONES

La cuantificación de OTA por cromatografía líquida de alto rendimiento y extracción por cromatografía de inmunoafinidad es un método eficiente, el cual es adecuado para el análisis de diversas matrices como en el caso del cacao. Los resultados obtenidos indican que el cacao blanco de Piura presenta OTA en la etapa de fermentación, la más proclive a sufrir dicha contaminación. El contenido de OTA encontrado en la etapa de fermentado fue de $1,92 \pm 0,02$ $\mu\text{g}/\text{kg}$. Las etapas de cosecha, secado y almacenamiento del proceso de producción de cacao en Piura no mostraron cantidades detectables de OTA.

AGRADECIMIENTOS

A la Asociación de Pequeños Productores de Cacao de Piura (APPROCAP), al Laboratorio de Investigación y Certificaciones (LABICER) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería y al Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkwicz A, Novotna E. Ochratoxin A: Developmental and Reproductive Toxicity-An Overview. *Birth Defects Res B.* 2013;98(6):493-502.
2. Sugita-konishi Y, Tanaka T, Nakajima M, Fujita K, Norizuki H, Mochizuki N, et al. The comparison of two clean-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans. *Talanta.* 2006;69(3):650-5.
3. Afsah-Hejri L, Jinap S, Mirhosseini H. Ochratoxin A quantification: Newly developed HPLC conditions. *Food Control.* 2012;23(1):113-9.
4. Copetti M, Iamanaka B, Pitt J, Taniwaki M. Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. *Int J Food Microbiol.* 2014;178:13-20.
5. Chire G, Valdivia R, Ureña M. Ocratoxina A en cacao y derivados. Medidas preventivas. *Ciencia e Investigación,* 2014;17(1):9-15.
6. Tafuri A, Ferracane R, Ritieni A. Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. *Food Chem.* 2004;88(4):487-94.
7. Mounjouenpou P, Gueule D, Fontana-Tachon A, Guyot B, Tondje P, Guiraud J. Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon. *Int J Food Microbiol.* 2008;121(2):234-41.
8. De Magalhães J, Sodr e G, Viscogliosi H, Grenier-Loustalot M. Occurrence of Ochratoxin A in Brazilian cocoa beans. *Food Control.* 2011;22(5):744-8.
9. Copetti M, Pereira J, Iamanaka B, Pitt J, Taniwaki M. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *Int J Food Microbiol.* 2010;143(1-2):67-70.
10. Copetti M, Iamanaka B, Moror r R, Pereira J, Frisvad J, Taniwaki M. The effect of cocoa fermentation and weak organic acids on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* species. *Int J Food Microbiol.* 2012;155(3):158-64.

EVALUACIÓN Y TRATAMIENTO DE EFLUENTES DEL REMOJO CONVENCIONAL Y ENZIMÁTICO DE PIELES, POR PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS Y COAGULACIÓN

Yasmín Liseth Castañeda C^a, Rocío Vargas P.^b, Mary Flor Césare C^a, Lizardo Visitación F.^a

RESUMEN

Esta investigación evaluó y caracterizó efluentes del proceso de remojo convencional y enzimático de pieles, fue realizada a escala industrial con 20 pieles de ganado vacuno en las instalaciones de la empresa Helianthus S.A.C. Lima, Perú. Asimismo, se evaluó un sistema de tratamiento para dichos efluentes, constituido por precipitación de proteínas seguida de coagulación. Finalmente, el lodo seco de cada tratamiento se evaluó por separado para su potencial uso como fertilizante. La precipitación química de proteínas fue realizada aplicando un pH de 10, 11 y 12, usando KOH; mientras que en la coagulación se usaron dosis de 600, 800 y 1000 mg/L de sulfato de aluminio al 17%. En el remojo convencional, el sistema de tratamiento propuesto logró eficiencias de 70,3%; 84,9%; 92,4%; 93,4%; 61,8%; 93,9% y 99,6%; mientras que en el remojo enzimático, 80,5%; 83,8%; 93,3%; 93,8%; 59,3%; 93,5% y 99,4% en términos de DBO, DQO, SST, AyG, NTK, S²⁻ y turbidez, respectivamente. El agua residual del proceso enzimático presentó mayor carga contaminante que el proceso convencional, probablemente relacionado a una mejor limpieza de las pieles por parte de la enzima Tanzyme RD04 utilizada. Para el tratamiento del efluente del remojo convencional y el enzimático, el pH óptimo de precipitación química fue 12 y la dosis óptima de coagulante, 800 mg/L. Los lodos residuales obtenidos presentan un alto contenido orgánico.

Palabras clave: Remojo enzimático, remojo convencional, precipitación de proteína, coagulación, tratamiento.

EVALUATION AND TREATMENT OF EFFLUENTS OF THE CONVENCIONAL AND THE ENZYMATIC LEATHER SOAKING PROCESSES, BY PROTEIN PRECIPITATION AND COAGULATION

ABSTRACT

This research consisted of the evaluation and characterization of wastewater generated during

^a Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental del Departamento Académico de Química de la Facultad de Ciencias de la UNALM Lima - Perú.

^{*} e-mail: ycastanedacalderon@gmail.com

^b Helianthus SAC, Laboratorio de desarrollo e Investigación curtiembre, Av. Guardia Civil #314 Chorrillos - Lima - Perú

the leather soaking process, both in its conventional method and its enzymatic method. The experiments were conducted at an industrial scale at the Helianthus S.A.C. Company in Lima, using 20 cow hides. Likewise, a treatment process was evaluated for these effluents consisting of protein precipitation and was followed by coagulation. Finally, the dry sludge from each treatment method was evaluated separately for its potential use as fertilizer. The process for the chemical precipitation of proteins consisted of applying KOH until reaching pH values of 10, 11 and 12; while the coagulation process consisted of the application of doses of 600, 800 and 1000 mg/L of aluminum sulphate 17%. When using the conventional soaking process wastewater, the proposed treatment system achieved removal efficiencies of 70.3%, 84.9%, 92.4%, 93.4%, 61.8%, 93.9% and 99.6%; when using the enzymatic soaking process wastewater, the system achieved 80.5%, 83.8%, 93.3%, 93.8%, 59.3%; 93.5% and 99.4% removal efficiencies of BOD, COD, TSS, O&F, TKN, S²⁻ and turbidity, respectively. The wastewater from the enzymatic soaking process had a higher level of pollutants than the one from conventional soaking, likely due to a better soaking of the hides with the Tanzyme RD04 enzyme which was used.

For the treatment of effluents from the conventional as well as the enzymatic soaking process, the optimum precipitation pH was 12 and the optimum coagulation dose for both effluents was 800 mg/L. The organic content in the sludge was high.

Key words: Enzymatic soaking, conventional soaking, protein precipitation, coagulation, treatment.

INTRODUCCIÓN

La primera operación de una curtiembre es el remojo, en donde se tratan las pieles con agua¹. El remojo convencional utiliza de 100 a 1000% de agua con respecto al peso de piel salada^{1,2}, NaOH (basificante) para saponificar grasas, nonil fenol (tensoactivo) para acelerar la humectación de la piel, solubilizar suciedades y emulsificar grasas, Na₂S para favorecer el hinchamiento débil y penetración del agua a las fibras, bactericida (antiséptico) con la finalidad de eliminar bacterias y evitar perjuicios en la calidad final del cuero. También, busca la remoción de proteínas solubles en agua e insumos usados en la conservación de la piel^{1,3}. El nonil fenol es altamente tóxico, capaz de interferir con los sistemas de regulación de diferentes tipos de células y, tiene alta persistencia en el ambiente, incluso en algunos países está prohibido su uso⁴.

El uso de enzimas forma parte de una Producción Más Limpia^{1,2}, estas sustituyen a tensoactivos, basificantes y sales neutras. La biotecnología se encuentra en continuo avance, diversos tipos de enzimas se vienen ensayando para el remojo, la enzima Tanzyme RD 04 usada en esta investigación es recomendada para una operación más rápida que el proceso convencional, una alta remoción de materia orgánica, una mayor actividad queratolítica, mediana actividad lipolítica y una baja actividad colagenolítica⁵. Se alcanzaron resultados exitosos utilizando esta tecnología en comparación con los procesos químicos convencionales de remojo^{5,6},

obteniéndose mayor grado de rehidratación y limpieza debido a la eliminación de proteínas y grasas⁶ y, menor tiempo de remojo requerido^{5,6}, obteniendo una mejor calidad de cuero y menor impacto ambiental.

El efluente de remojo de pieles preservadas con sal tiene menor posibilidad de ser tratado por un sistema biológico convencional, a pesar de su alto contenido de proteínas, materia suspendida como suciedad, excremento y sangre⁷. Asimismo, debido a su elevado contenido de impurezas y un pH favorable para el crecimiento de bacterias, presenta condiciones propicias para su putrefacción^{1,7}, siendo un efluente no idóneo para reciclaje, al menos no en su totalidad. Por tal motivo, requiere un sistema de tratamiento químico. Las proteínas del efluente pueden ser removidas con un pH óptimo de precipitación química, lo cual es corroborado por muchas investigaciones, las cuales han obtenido hasta 60% de remoción⁸. Asimismo, han reportado que se ha conseguido muy buenos resultados⁹ con el tratamiento físico químico mediante coagulación, constituyendo una buena alternativa de tratamiento para la remoción de sólidos y materia orgánica del efluente de remojo.

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la calidad del efluente para un remojo convencional (con químicos) y un remojo alternativo (con enzimas). Así como evaluar un sistema de tratamiento mediante precipitación de proteínas con ajuste de pH, seguido de un proceso de coagulación para los efluentes de ambos remojos, con la finalidad de que cumplan con los Valores Máximo Permisibles (VMA) de las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario indicados en el D.S. 001-2015 VIVIENDA. Se evaluó también el potencial uso como fertilizante de los lodos residuales producidos por el sistema de tratamiento propuesto.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Procedimiento de proceso de remojo

Se evaluaron dos tipos de remojo, convencional y alternativo, previa preservación de pieles con sal. El remojo convencional considera las condiciones promedio llevadas a cabo en las curtiembres del Perú; mientras que el remojo alternativo utiliza enzimas microbianas en sustitución de tensoactivos, desengrasantes y basificantes. Las fórmulas químicas para la realización de ambos remojos se indican en la tabla 1, las cuales fueron proporcionadas por la empresa Helianthus S.A.C.

Tabla 1. Materias primas utilizadas en el remojo convencional y en el enzimático.

Etapa	Productos	Remojo		Tiempo
		Conv.	Enz.	
Lavado inicial del remojo	Agua (28°C)	200,0	200,0	60'
	Agua (28°C)	200,0	100,0	
Remojo principal	NaOH	0,2	-	6 horas: 5' mov. / 25' parada
	Tensoactivo Nonil fenol	0,3	-	
	Na ₂ S	0,1	-	
	Bactericida	0,1	0,1	
Lavado final del remojo	Enzima Tanzyme RD 04	-	0,2	15'
	Agua (28°C)	100,0	100,0	

*Todos los productos son dados en % con respecto al peso del cuero fresco salado (peso tomado después de la preservación de las pieles).

Caracterización de efluentes de los remojos convencional y enzimático

Los efluentes de los remojos convencional y enzimático fueron colectados como resultado de una prueba a escala industrial con 20 pieles de ganado vacuno, cada uno, realizada en un botal en las instalaciones de la empresa Helianthus S.A.C. Lima, Perú. Posteriormente, fueron caracterizados. En la tabla 2 se puede observar los parámetros analizados.

Se efectuaron ajustes a los valores de DQO, el alto contenido de Cl⁻ generó grandes interferencias, por ello se realizaron blancos de Cl⁻.

Tabla 2. Parámetros analizados a los efluentes de remojo.

Parámetros	Unid.	Método
Turbidez	NTU	20 ^{va} ed. 2130 B M. Nefelométrico.
EC	mS/cm	M. Electrométrico
SST	mg/L	20 ^{va} ed. 2540 D SST secados a 103-105°C.
SS	ml/L	20 ^{va} ed. 2540 F Sólidos sedimentables.
DBO ₅	mg/L	20 ^{va} ed. 5210 B Prueba ROB de 5 días.
DQO	mg/L	20 ^{va} ed. 5220 D Reflujo cerrado, M. Colorimétrico.
pH	-	20 ^{va} ed. 4500-H ⁺ Electrométrico.
AyG	mg/L	20 ^{va} ed. 5520 B Partición - gravimetría.
S ²⁻	mg/L	20 ^{va} ed. 4500-S ²⁻ E Yodométrico.
SO ₄ ²⁻	mg/L	20 ^{va} ed. 4500-SO ₄ ²⁻ E Turbidimétrico.
NH ₃	mg/L	20 ^{va} ed. 4500-NH ₃ E Titulométrico.
NTK	mg/L	20 ^{va} ed. 4500-N _{org} C Semi-micro- Kjeldahl.
Cl ⁻	mg/L	20 ^{va} ed. 4500-Cl ⁻ B Argentométrico.
Cr ⁺⁶	mg/L	20 ^{va} ed. 3500-Cr B Abs. Atómica para Cr total.
Hg	mg/L	21 ^{ra} ed. 3112-B Espectrométrico Abs. Atómica de vapor frío.
Metales Totales	mg/L	EPA 200.7 (1994).

Sistema de tratamiento propuesto de efluentes

El sistema de tratamiento propuesto para los efluentes de los procesos de remojo convencional y enzimático se desarrolló en dos etapas. Cada remojo presentó tres baños, es decir, tres efluentes; el tratamiento fue realizado al efluente mezcla de los tres baños. La primera etapa consistió en la precipitación de proteínas por cambio de pH utilizando HCl e KOH (grado reactivo), se ensayaron pH ácidos de 2, 3 y 5 y, básicos de 10, 11 y 12. Se evaluó la influencia del pH sobre la remoción de proteína en términos de NTK, DQO, SST y turbidez. Se determinó el pH óptimo de precipitación y a este se le realizaron análisis adicionales de AyG, S²⁻ y SS.

El sobrenadante de la precipitación de proteínas fue sifonado hacia otros recipientes donde se ajustó a pH neutro. Posteriormente, fue sometido a coagulación mediante el uso de test de jarras bajo las condiciones recomendadas para agua residual industrial¹⁰. Siendo las dosis de Al₂(SO₄)₃ aplicadas: 600, 800 y 1000 mg/L. Posteriormente, se evaluó la influencia de las dosis de aluminio en la remoción de contaminantes en términos de NTK, DQO, SST y turbidez. Se determinó la dosis óptima de coagulación y a esta se le realizaron análisis adicionales de AyG, S²⁻ y SS.

Para ambos tratamientos se realizaron pruebas por triplicado.

Análisis estadístico de los resultados

El software utilizado fue IBM SPSS Statistics. Se planteó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Para ambos tipos de remojo y para los dos tipos de tratamientos consecutivos aplicados, se realizó validación estadística evaluada por ANOVA (análisis de variancia) para analizar si los pH o las dosis de aluminio aplicados influyen en los parámetros analizados. Se utilizó la Prueba de Tukey para evaluar la significancia entre los tratamientos realizados. Adicionalmente, se evaluó el Coeficiente de Variabilidad en términos porcentuales entre los tratamientos para verificar la dispersión correspondiente a una serie de datos respecto al valor medio.

Evaluación del potencial como fertilizante de los lodos provenientes del sistema de tratamiento propuesto

Los lodos residuales obtenidos en los tratamientos con pH óptimo de precipitación y dosis óptima de coagulación para los efluentes del remojo convencional y el enzimático, fueron secados y pulverizados, posteriormente analizados por su potencial como fertilizante y fueron comparados con el vermicompost. El vermicompost es un abono de establo, orgánico producido como el compost por la alimentación de materiales de desechos orgánicos por parte de las lombrices. Este tipo de abono contiene una fuente de nutrientes en equilibrio que es preferido para la agricultura ecológica y respetuosa con el medio ambiente³. Los parámetros evaluados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros analizados al lodo residual.

Parámetros	Abrev.	Unid.
Humedad	H	%
Ceniza	-	% MS
Carbono orgánico total	COT	% MS
Nitrógeno	N	% MS
Relación carbono-nitrógeno	C/N	-
Contenido de potasio	P ₂ O ₅	%
Contenido de fósforo	K ₂ O	%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de efluentes de los remojos convencional y enzimático

Los resultados de la caracterización de efluentes de los remojos convencional y enzimático, son presentados en la tabla 4.

Para el efluente “lavado inicial del remojo convencional”, los AyG (228 mg/L), DQO (2227 mg/L) y NTK (158,1 mg/L) fueron menores a los indicados por Bornhardt, Vidal y Torres (395 y 2890, 215 mg/L, respectivamente)¹¹; mientras que los SO₄²⁻ (78 mg/L) y DBO₅ (620 mg/L) fueron mayores a los reportados por dichos autores (60 y 390 mg/L, respectivamente)¹¹. Los SST (1208 mg/L) y NH₃ (77,6 mg/L) resultaron menores a los dados por Méndez, Vidal, Lorber y Márquez¹² (1500 y 86 mg/L, respectivamente); mientras que el S²⁻ (14,1 mg/L) fue mucho mayor y, el pH (7) muy similar a los reportados por dicho autor (0,003 mg/L y 6,9, respectivamente)¹². Este efluente, en términos de SST, DBO y DQO, es superado en 1,87; 0,37 y 0,17 veces más, respectivamente. por el efluente del lavado inicial del remojo enzimático. Las diferencias en las concentraciones entre ambos efluentes y las encontradas con otros autores, se atribuyen a las características de la piel, ya que el único insumo utilizado en esta etapa, además de la piel, fue el agua. Por lo tanto, las pieles usadas en el remojo enzimático presentaron mayor grado de ensuciamiento pero se mantuvieron en mejor grado de conservación (NH₃=56,35 mg/L) que las usadas en el remojo convencional (NH₃=77,6). Los parámetros EC y Cl⁻, están relacionados directamente con la conservación y, su variación se debe al grado de absorción del agua en la piel.

Para el efluente “remojo principal convencional”, la DQO (13807 mg/L) fue similar a lo indicado por Bornhardt *et. al*¹¹ (13780 mg/L), sin embargo los SO₄²⁻ (237,7 mg/L) y NTK (660,3 mg/L) fueron menores y, los Cl⁻ (17073 mg/L) mayores a lo indicado por dicho autor (350, 795 y 11675 mg/L, respectivamente). El pH (9) y NH₃ (96,7 mg/L) resultaron similares a lo reportado por Méndez *et. al*¹² (8,7 y 18 a 210 mg/L, respectivamente), mientras que los S²⁻ (37,6 mg/L) y los SST (5621 mg/L) fueron superiores (3 y 4140 mg/L, respectivamente) y, la DBO₅ (1000 mg/L) menor a lo indicado por dicho autor (2870 mg/L). Este efluente en términos de SST, DBO, DQO, SO₄²⁻, NH₃ y NTK es superado en 0,8; 0,35; 0,11; 0,83; 0,65 y 0,31 veces más, respectivamente, por el efluente de remojo principal enzimático. El tensoactivo generó mayor emulsión de grasas lo que se traduce en un mayor contenido de AyG en el baño; mientras que la enzima realizó un mejor ataque a proteínas y un mejor remojo de la piel, generando mayor carga contaminante en el baño.

Los valores de NTK (167,07 mg/L) y SST (1687 mg/L) fueron similares a lo reportado por Bornhardt *et. al*¹¹ (175 y 1470 mg/L, respectivamente); mientras que el DQO (3874 mg/L), SO_4^{2-} (139,2 mg/L), NH_3 (75,1) y el pH (8,85) resultaron mayores (3000, 35, 3 mg/L y 7,6, respectivamente) y, el valor de AyG (196 mg/L) fue menor a lo reportado por dicho autor (545 mg/L). Este efluente en términos de SST, DQO, AyG y NTK es superado en 1,8; 0,75; 0,54 y 0,72 veces más, respectivamente, por el efluente del lavado final del remojo enzimático. El poder limpiador de la enzima utilizada se impuso sobre el del tensoactivo, generando un mayor ataque a proteínas (actividad queratolítica) y grasas (actividad lipolítica) que generaron mayor carga contaminante en el efluente.

En lo que respecta al efluente mezcla del remojo convencional, el pH (8,2), NH_3 (84,7 mg/L) y NTK (360,7 mg/L) fueron similares a lo reportado por Lefebvre, Vasudevan, Torrijosa, Thanasekaran y Moletta¹³ (7,8 y 90 y 350 mg/L, respectivamente); mientras que la DQO (7188 mg/L) fue menor a lo indicado por dichos autores (8280 mg/L). Los SST (3069,1 mg/L) resultaron semejantes a lo indicado por Ilou, Souabi y Digua¹⁴ (3000 mg/L); mientras que los S^{2-} (26,3) fueron casi el doble de lo indicado por dichos autores (13,43 mg/L). La DBO_5 (908 mg/L) fue similar a lo reportado por Iyappan, Boopathy, Suguna, Ranganathan y Vedaraman¹⁵ (1016 mg/L); los AyG (323,4 mg/L) se encontraron en el rango dado por Miller, Gagnet y Worde¹⁶ (200 a 400 mg/L). Este efluente en términos de SST, DQO y NTK es superado en 1,8; 0,75 y 0,72 veces más por el efluente del lavado final del remojo enzimático. El mayor contenido de NTK en el remojo enzimático se debe a un mejor ataque a las proteínas de la piel generada por las enzimas⁵. El mayor contenido de AyG en el remojo convencional se debe a un mayor ataque de lípidos generado por la acción del nonil fenol (tensoactivo) y el NaOH. La concentración de S^{2-} superior en el remojo convencional se debe al uso de Na_2S . En términos generales el empleo de enzimas genera pieles mejor remojadas, lo que se traduce en una mejor limpieza de las mismas y mayor carga contaminante en el efluente.

Tabla 4. Caracterización de los efluentes del remojo convencional y enzimático.

Parámet.*	Remojo Convencional				Remojo Enzimático			
	Lav. Inicial	Remojo Princip.	Lav. Final	Efluente mezcla	Lav. Inicial	Remojo Princip.	Lav. Final	Efluente mezcla
T	22,0	22,0	21,0	-	24,0	24,3	25,0	-
Turbidez	-	-	-	3165,0	-	-	-	4470,0
P	-	-	-	29,32	-	-	-	51,05
EC	52,6	36,2	12,0	37,9	60,1	63,4	24,2	51,9
SST	1208,0	5621,0	1687,0	3069,1	3463,0	10137,0	4738,0	5450,3
SS	N.D.**	N.D.**	N.D.**	N.D.**	N.D.**	N.D.**	N.D.**	N.D.**
DBO_5	620,0	1000,0	1300,0	908,0	850,0	1350	1050,0	1025,0
DQO	2227,0	13807,0	3874,0	7188,0	2618,2	15401	6784,9	6855,0
pH	7,0	9,0	8,9	8,2	7,4	7,2	7,5	7,4
AyG	228,0	482,5	196,0	323,4	84,0	428,0	302,0	224,5
S^{2-}	14,1	37,6	28,2	26,3	10,6	18,8	21,9	15,5
SO_4^{2-}	78,0	237,7	139,2	154,1	85,8	436,1	143,9	187,9
NH_3	77,60	96,7	75,1	84,7	56,4	159,7	66,9	84,8
NTK	158,1	660,3	167,1	360,7	201,1	865,3	286,9	388,6
Cl^-	24144,0	17073,0	5476,0	17582,0	27592,9	29317	9082,2	23906,6

*Todos los parámetros a excepción de T (°C), Turbidez (NTU), EC (mS/cm), SS (ml/L) y pH; son dados en mg/L.

**N.D. No detectable

Con respecto al contenido de metales del efluente mezcla del remojo convencional, Ilou *et.al*¹⁴ reportó valores de: 0,004; 0,202; 0,12; 8,27; 0,01; 0,007; 0,73 y 1,85 mg/L, para: cadmio, cromo, cobre, hierro, mercurio, níquel, plomo y zinc, respectivamente; mientras que los valores encontrados en la presente investigación fueron: 0,082; 0,357; 0,039; 1,89; <0,0001; 0,0048; 0,081 y 0,587, respectivamente (tabla 5). La concentración de hierro encontrada es baja, este metal tiene una relación muy estrecha con la sangre eliminada en el baño del remojo (en algunos lugares de beneficio del ganado vacuno, lavan las pieles después de la matanza, reduciendo la sangre). En general, las concentraciones de metales están relacionadas a la alimentación del ganado vacuno, fuentes de agua y pastizales con presencia de metales en donde ellos han sido criados. No se evidencia valores altos de ninguno de los metales analizados a diferencia del sodio, valor alto producto de la conservación previa con sal industrial.

Tabla 5. Caracterización de metales en los efluentes mezcla de los remojos convencional y enzimático.

Parámetro*	Efluente mezcla remojo	
	Convencional	Enzimático
Cr ⁺⁶	<0,01	<0,01
Hg	<0,0001	0,0009
Al	0,965	1,406
Sb	0,013	0,081
As	< 0,005	0,024
Ba	0,0536	0,0864
Be	<0,0002	<0,0002
Bi	0,023	0,025
B	0,299	0,369
Cd	0,0082	0,0196
Ca	229,4	344,5
Ce	<0,004	0,007
Co	0,003	0,006
Cu	0,039	0,717
Cr	0,357	0,565
Sn	0,162	0,241
Sr	1,69	2,64
Fe	1,891	2,656
Li	0,131	0,130
K	136,4	178,7
Na	>20,0	>20,0
Ti	0,013	0,033
V	0,0031	0,0078
Zn	0,587	0,773
Mg	21,54	>50,0
Mn	0,083	0,192
Mo	0,0111	0,0976
Ni	0,0048	0,0089
Ag	<0,0009	0,0114
Pb	0,081	0,112

*Todos los parámetros son dados en mg/L

Influencia del pH en el tratamiento y precipitación de proteína

La precipitación en medio ácido no consiguió una adecuada desestabilización de proteínas, lo cual indica que el punto isoeléctrico de la mezcla de proteínas del efluente mezcla para ambos remojos no se encontraba en medio ácido, generando una pobre formación de coágulos.

Las máximas remociones de eficiencia obtenidas para el efluente mezcla del remojo convencional fueron 88,4; 56,1; 43,2 y 26,4% (tabla 7); mientras que para el efluente mezcla del remojo enzimático, 97,8; 81,3; 57,9 y 31,2% (tabla 7) en términos de turbidez, SST, DQO y NTK, respectivamente. La eficiencia alcanzada en SST para remojo convencional es similar a lo reportado por Mijaylova, Moeller y Juárez¹⁷ (60%) para el baño de curtido. Las eficiencias obtenidas para DQO (tabla 7) son semejantes a los 44,3% reportados por Córdova¹⁸ para un pH de 10,71 del efluente de curtido. La eficiencia de NTK para ambos remojos (tabla 7) es menor a lo indicado por dicho autor (59,75%) debido a que el efluente de curtido presentó mayor proteína en el baño. En general, las concentraciones de los parámetros evaluados disminuyen en los efluentes de ambos remojos cuando se incrementa el pH, alcanzando remociones máximas a pH 12 (tabla 7). La mezcla de proteínas cuyo punto isoeléctrico es cercano a 12, ha sido removida en su totalidad o en gran proporción del efluente para ambos tipos de remojo, limitando su solubilidad y facilitando su precipitación. El valor aún alto de nitrógeno en el efluente (tabla 7), indica que quedan en disolución las proteínas cuyos valores de pH isoeléctricos se hallen por debajo o por encima de 12.

Tabla 6. Caracterización de metales en los efluentes mezcla de los remojos convencional y enzimático.

Efluente	Parámetros*	C. inicial	Valor de pH					
			10		11		12	
			C. Final	E.R. **	C. Final	E.R. **	C. Final	E.R. **
Remojo Conv.	Turbidez	3165,0	829,0	73,8	496,3	84,3	368,0	88,4
	SST	3069,1	2353,0	23,3	2011,0	34,5	1348,0	56,1
	DQO	7188,0	5843,0	18,7	4640,0	35,4	4083,0	43,2
	NTK	360,7	319,7	11,4	297,4	17,6	265,4	26,4
Remojo Enz.	Turbidez	4470,0	550,1	87,7	390,7	91,3	97,2	97,8
	SST	5450,3	1371,0	74,8	1322,0	75,7	1021,0	81,3
	DQO	6855,0	4030,0	41,2	3843,0	43,9	2883,0	57,9
	NTK	388,6	319,8	17,7	308,4	20,6	267,4	31,2

* Todos los parámetros a excepción de la turbidez (NTU) son dados en mg/L.

** E.R.: eficiencia de remoción en %.

Influencia de la dosis de aluminio en el tratamiento

Las máximas remociones de eficiencia obtenidas para el efluente mezcla del remojo convencional fueron 96,8; 82,7; 73,5 y 48,1% (tabla 8); mientras que para el efluente mezcla del remojo enzimático, 73,4; 64,4; 60,7 y 40,8% (tabla 8) en términos de turbidez, SST, DQO y NTK, respectivamente. Las eficiencias alcanzadas en turbidez, DQO y SST fueron similares a lo reportado por Cerón⁹ (94,45; 58,5 y 89,2%, respectivamente) para el efluente de remojo con 250 mg/L de FeCl₃. En términos generales, las eficiencias obtenidas por una dosis mayor a 800 mg/L de Al₂(SO₄)₃ al 17% disminuyen (tabla 8), lo que se asocia a una resuspensión de los coloides a causa de un exceso en la dosificación del coagulante. A partir de estas observaciones, la dosis de 800 mg/L fue seleccionada como la dosis óptima de coagulación para ambos remojos. De los valores obtenidos (tabla 8), se observa que en el efluente tratado aún existe alto contenido orgánico disuelto.

Tabla 7. Influencia de la dosis de aluminio en el tratamiento

Efluente	Parámetros	C. inicial	Dosis de aluminio (mg/L)					
			600		800		1000	
			C. Final	E.R. **	C. Final	E.R. **	C. Final	E.R. **
Remojo Conv.	Turbidez	368,0	25,8	93,0	11,8	96,8	18,17	95,1
	SST	1348,0	545,0	59,6	232,8	82,7	421,1	68,8
	DQO	4083,0	1963,0	51,9	1083,0	73,5	1533,0	62,5
Remojo Enz.	NTK	265,4	180,9	31,8	137,7	48,1	164,6	38,0
	Turbidez	97,2	37,0	61,9	25,9	73,4	30,8	68,3
	SST	1021,0	464,0	54,6	363,0	64,4	405,0	60,3
Remojo Enz.	DQO	2883,0	2043,0	29,1	1133,0	60,7	1720,0	40,3
	NTK	267,4	171,0	36,1	158,3	40,8	169,0	36,8

* Todos los parámetros a excepción de la turbidez (NTU) son dados en mg/L.

** E.R: eficiencia de remoción en %.

Sistema de tratamiento de efluentes propuesto

Para ambos tipos de remojos, el pH óptimo fue 12 (tabla 7) y la dosis óptima de aluminio fue 800 mg/L (tabla 8). Con el sistema de tratamiento propuesto se obtienen remociones en S²- de 93,9% y 93,5% para el remojo convencional y el enzimático, respectivamente (tabla 9). Asimismo, las eficiencias totales obtenidas por el sistema de tratamiento propuesto fueron similares, sin variación significativa. Se obtuvieron remociones de DBO₅ por encima del 70% para ambos remojos (tabla 9).

Las concentraciones de los parámetros analizados obtenidas posteriores al tratamiento propuesto (tabla 9), de los parámetros analizados, cumplen con los Valores Máximo Permisibles (VMA) indicados en el D.S. 001-2015 VIVIENDA, a excepción de la DQO que en ambos remojos se requerirá un sistema de pulimento del efluente ya que su límite según normativa es 1000 mg/L.

Tabla 8. Caracterización del sistema de tratamiento de efluentes propuesto

Parámet.	Remojo convencional				Remojo enzimático			
	Efluente mezcla	Trat. 1 (***)	Trat. 2. (****)	E.R. **	Efluente mezcla	Trat. 1 (***)	Trat. 2. (****)	E.R. **
DBO ₅	908,0	500,0	270,0	70,3	1025,0	600,0	200,0	80,5
DQO	7188,0	4083,0	1083,0	84,9	6855,0	2883,0	1133,0	83,5
SST	3069,1	1348,0	232,8	92,4	5450,3	1021,0	363,0	93,3
AyG	323,4	55,5	21,5	93,4	224,5	27,0	14,0	93,8
NTK	360,7	265,4	137,7	61,8	388,6	267,4	158,3	59,3
Turbidez	3165,0	368,0	11,8	99,6	4470,0	97,2	25,9	99,4
Sulfuros	26,3	5,5	1,6	93,9	15,5	1,4	1,0	93,5
SS	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	-
Cloruros	17 582,0	17 590,4	17 547,3	-	23906,6	24057,5	23971,3	-
EC	37,9	38,4	38,1	-	51,9	53,3	52,7	-

*Todos los parámetros a excepción de Turbidez (NTU) y SS (ml/L) son dados en mg/L.

** E.R: eficiencia de remoción %.

***:E.M. Después de precip. pH óptimo.

****: Después de coagulación con dosis óptima.

Análisis estadísticos de los resultados

Para los parámetros evaluados: DQO, SST, NTK y turbidez; en la determinación del pH óptimo de precipitación con hidróxido de potasio, y en la dosis óptima de aluminio para los efluentes del remojo convencional y el enzimático, según el análisis de ANOVA al menos un valor de pH y una dosis de aluminio influyen sobre la concentración de los parámetros evaluados (el valor de significancia para cada parámetro evaluado fue menor a 0,05 por lo cual se rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas)¹⁹. Según el análisis de Tukey realizado, los distintos tipos de pH y dosis óptima de aluminio generan efectos de remoción diferentes entre los parámetros evaluados, por los que estadísticamente son diferentes. Para todos los resultados obtenidos, el coeficiente de variabilidad entre las concentraciones de los parámetros analizados, resultaron menores de 25%, lo que respalda la obtención de resultados homogéneos entre las repeticiones realizadas.

Caracterización del lodo residual

De los resultados obtenidos (tabla 10) se observa que el contenido de COT para los lodos de ambos remojos provenientes de la coagulación con aluminio (14,4 Conv. y 14,6 Enz.) es cercano al valor del vermicompost³; mientras que para el de precipitación con KOH el valor (29,3 Conv. y 24,9 Enz.) es casi tres veces lo recomendado³. En la tabla 10 se puede observar que el contenido de nitrógeno para ambos tipos de lodos se encuentra cercano al valor del vermicompost³; mientras que el contenido de fósforo es mayor en el lodo de la precipitación con KOH del remojo convencional (1,44). Para los demás casos, se encuentra por debajo del valor del vermicompost³. El contenido de potasio es mucho mayor para todos los tipos de lodos generados (tabla 10).

Debido a la conservación de la piel con sal industrial, el lodo residual tiene alto contenido de sal, ya que proviene de un efluente con una concentración de NaOH mayor a 20 mg/L (tabla 5), lo cual no lo hace viable como buen fertilizante, a pesar de su alto contenido en nutrientes

y compuestos orgánicos. Si se utilizase un tipo de conservación que no implique la adición de sodio, tal como preservación de pieles por refrigeración o el uso de pieles frescas, estos lodos podrían ser usados como fertilizante.

Tabla 9. Caracterización de lodo residual

Parámetro	Unid.	Vermicompost ³	Remojo Conv.		Remojo Enz.	
			Precip. KOH	Precip. Al	Precip. KOH	Precip. Al
Humedad	%	-	93,50	94,80	94,00	96,00
Ceniza	% MS	-	46,80	71,20	51,80	67,20
COT	% MS	9,97-10,62	29,30	14,40	24,90	14,60
N	% MS	1,80	2,30	2,80	2,30	3,10
C/N	-	-	12,70	5,20	10,60	4,80
P ₂ O ₅	%	0,90	1,44	0,26	0,76	0,18
K ₂ O	%	0,40	1,94	3,20	2,51	2,80

CONCLUSIONES

El efluente mezcla del remojo alternativo con enzimas presenta mayor carga contaminante que el efluente mezcla del remojo convencional con químicos, debido a la mayor acción limpiadora y más eficiente remojo de pieles generada por la enzima Tanzyme RD04 en comparación con los otros químicos. Sin embargo, el remojo enzimático usa 20% menos de agua que el remojo químico, es decir, el efluente tiene ligeramente más carga pero su volumen es menor. Se obtuvieron remociones muy altas en el sistema de tratamiento aplicado a los efluentes de ambos remojos. Para ambos tipos de remojo, el pH óptimo de precipitación con hidróxido de potasio es de 12 y la dosis de coagulante sulfato de aluminio es de 800 mg/L. El contenido orgánico del lodo es alto, si se utilizara un método alternativo a la preservación de pieles con cloruro de sodio, el lodo podría tener un uso como fertilizante.

AGRADECIMIENTO

Se agradece al Fondo de Investigación y Desarrollo para la Competitividad (FIDECOM) que por medio de los Proyectos de Innovación Productiva para Empresas Individuales (PIPEI) y el Convenio N°022-FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2012, entre la empresa HELIANTHUS S.A.C y el Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental (CIQTOBIA) del Departamento Académico de Química de la UNALM, financiaron la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hoinacki E, Moreira M, Kiefer C. Manual básico de processamento de couro. Porto Alegre: Ed. SENAI/RS; 1994.
2. Centro de Promoción de Tecnologías Sostenibles (CPTS). Guía Técnica de Producción más limpia para curtiembres. 1ra ed. La Paz: CPTS; 2003.
3. Das C, DasGupta S, De S. Treatment of soaking effluent from a tannery using membrane separation processes. *Desalination*. 2007;216(1-3):160-73.
4. Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN. Nonyphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *J Environ Int*. 2008; 34: 1033-1049.
5. Souza F, Guterres M. Application of enzymes in leather processing: a comparison between chemical and coenzymatic processes. *Braz J Chem Eng*. 2012; 29 (3): 473-482.
6. Herrmann L. Enzimas no proceso de Industrialização do Couro. *Revista do Couro*. 2006; 186: 92-94.
7. Kaul SN, Nandy Tapas, Szpyrkowicz L, Gautam A, Khanna DR. Wastewater management with special reference to tanneries. New Delhi: Discovery Publishing House; 2005.
8. Kbdasli I, Ölmez T, Tüng O. Nitrogen removal from tannery wastewater by protein recovery. *Water Sci Technol*. 2003; 48: 215-223.
9. Cerón P. Estudio de un sistema físico-químico a escala prototipo de tratamiento de aguas residuales provenientes de una curtiembre [Tesis de pregrado]. Quito: Universidad San Francisco de Quito; 2011.
10. Haydar S, Aziz J. Characterization and treatability studies of tannery wastewater using chemically enhanced primary treatment (CEPT). A case study of Saddiq Leather Works. *J Hazard Mater*. 2009; 163: 1076-1083.
11. Bornhardt C, Vidal G y Torres M. Reducción del impacto ambiental generado por efluentes de la industria de curtiembre. XXVII Congreso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental; 3-8 nov 2000; Porto Alegre-Brasil.
12. Méndez R, Vidal G., Lorber K, Márquez F. Producción limpia en la industria de curtiembre. Compostela: Ediciones Servicio de Publicacións e Intercambio Científico da USC; 2007.
13. Lefebvre O, Vasudevan N, Torrijosa M, Thanasekaran K y Moletta R. Anaerobic digestion of tannery soak liquor with an aerobic post-treatment. *J Water Res*. 2006; 40: 1492-1500.
14. Ilou I, Souabi S y Digua K. 2012. Quantification of Pollution Discharges from Tannery Wastewater and Pollution Reduction by Pre-Treatment Station. *Int J Sci Res*. 2012; 3(5):1706-1715.
15. Iyappan K, Boopathy R, Suguna L, Ranganathan, N. y Vedaraman, N. Electro-oxidación of tannery soak water using solar photovoltaic stand-alone systems. *J Acad Indus*. 2012; 4:2278-5213.
16. Miller S, Gagnet A y Worde R. Reporte Técnico para la Industria de Curtiembres en el Perú. Informe para el Ministerio de Industria, Turismo, Integración y Comercio Internacional (MITINCI). 1999.
17. Mijaylova P, Moeller G y Juárez M. Alternative treatment strategy for tannery water

- reuse and material recovery. *Water Sci Technol*. 2014. 50 (2):121-130.
18. Córdova H. Minimización de emisiones de cromo en el proceso de curtido, por uso de complejantes y basificantes de cromo y tratamiento de efluentes. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 2014.
 19. Salkind N. *Métodos de investigación*. México D.F.: Prentice Hall; 1999: 225-226.

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO FENTON EN EL TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS DE RELLENOS SANITARIOS

Medina Valderrama, Carlos Javier^{1*}, Montero del Águila, Edgar Michel¹, Cruz Pio, Liz Erika²

RESUMEN

En el presente estudio se optimizó el proceso Fenton en el tratamiento de los lixiviados del relleno sanitario “Aguas de las Vírgenes”, Huancayo-Perú. Los parámetros evaluados fueron: DBO₅, DQO, alcalinidad, dureza, pH, conductividad, sólidos totales, turbidez, Pb y Cd. Las muestras fueron tratadas en un sistema de jarras con agitación y para optimizar los valores de aplicación del proceso Fenton se utilizó el diseño Box – Behnken y la metodología de superficies de respuesta. Los valores óptimos se determinaron en dos temporadas, en época de lluvia (pH = 3,19, FeSO₄ = 1645,55 mg/L y H₂O₂ = 1096,55 mg/L) y en época de estiaje (pH = 3,26, FeSO₄ = 1788,61 mg/L y H₂O₂ = 1180,83 mg/L). El indicador de biodegradabilidad obtenido fue 0,568 y 0,329 en época de lluvia y estiaje, respectivamente, con una eliminación cercana al 42% de la DQO en ambas épocas de estudio. El proceso Fenton es una alternativa eficaz para tratamiento de sustancias persistentes en lixiviados y puede ser aplicado como post-tratamiento.

Palabras clave: proceso Fenton, lixiviado, aguas residuales, carga orgánica.

FENTON PROCESS OPTIMIZATION IN THE TREATMENT OF LANDFILL LEACHATES LIXIVIATED

ABSTRACT

In this study Fenton process was optimized in the treatment of landfill leachates “Aguas de las Virgenes”, Huancayo-Perú. The parameters tested were BOD₅, COD, alkalinity, hardness, pH, conductivity, total solids, turbidity, Pb and Cd. Samples were treated in a system of jars with stirring and to optimize the application values the Box – Behnken design and response surface methodology were used. The values of optimal concentrations were determined in two seasons: rainy seasons (pH = 3.19, 1645.55 mg/L of FeSO₄ and 1096.55 mg/L of H₂O₂) and dry seasons (pH = 3.26, 1788.61 mg/L of FeSO₄ and 1180.83 mg/L of H₂O₂). The optimal reaction time was 20 minutes for both seasons. The Biodegradability indicator was 0.568 and 0.329 in rainy seasons and dry seasons, respectively, with a near elimination of

¹ Laboratorio de Físicoquímica, Facultad de Ingeniería Química e Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque - Perú, javier.quimico@hotmail.com,

² Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima - Perú.

42% of the COD in both periods. Fenton process is an effective alternative for treatment persistent substances in leachates and can be applied post treatment.

Key words: Fenton process, leachate, landfill, organic load.

INTRODUCCIÓN

Los lixiviados son fluidos que brotan a la superficie o se infiltran hacia el terreno donde se encuentra instalado un relleno sanitario o un vertedero de basura, y arrastran a su paso material disuelto, en suspensión fija o volátil¹. Lamentablemente, se utilizan zonas aledañas a los ríos, lagos y acuíferos, como vertederos de residuos sólidos municipales, industriales y comerciales, sobrepasando su nivel de amortiguamiento natural y creando una amenaza latente tanto para el medioambiente como para las personas que puedan hacer uso del agua². Por ello, estos lixiviados se deben impermeabilizar, drenar adecuadamente, coleccionar y tratar, ya que existen numerosos reportes del impacto negativo que estos provocan³. Los lixiviados varían según el tipo de residuos que se confinan, nivel de precipitación en el lugar, grado de compactación, velocidades de descomposición química, flujo volumétrico, escurrimiento, evapotranspiración y condiciones de manejo del lixiviado; teniendo en cuenta todo esto, es difícil formular un sistema de tratamiento generalizado¹. Una opción atractiva para tratar dichos residuos es la aplicación de Procesos de Oxidación Avanzados, entre ellos, el proceso Fenton, una alternativa viable, efectiva y a costos relativamente bajos que puede ser utilizado como pre o post tratamiento biológico⁴. El proceso Fenton ocurre cuando se agrega un catalizador de sal ferrosa soluble en agua y peróxido de hidrógeno en un medio ácido, sin necesidad de recurrir a altas presiones, temperaturas o equipos sofisticados⁴. El responsable de los procesos oxidativos es el radical oxidrilo ($\text{OH}\cdot$), que reacciona rápidamente con muchos compuestos orgánicos (R) de manera no selectiva debido a su elevado potencial de oxidación (2,8 V)⁵. También es de vital importancia tener en cuenta la dosis correcta de los reactivos a utilizar. Por ello, diversos autores han utilizado el análisis de superficie de respuesta (SR) ya que es el más eficiente y representan mejor los efectos de la interacción entre las variables estudiadas y determinan con mayor precisión la combinación de los niveles que produce el óptimo del proceso^{6,7}. Además, tras la aplicación del proceso Fenton ocurre un cambio estructural sobre los compuestos orgánicos, esto facilita un eventual proceso biológico posterior a elección, pues la oxidación parcial (disminución de la toxicidad del efluente) o la total (formación de sustancias inocuas) hacen posible una descarga segura del efluente sin ningún tratamiento posterior o su conversión en sustancias más fácilmente biodegradables^{6,7}. El proceso Fenton ha sido aplicado para tratar lixiviados de rellenos sanitarios^{1,3}.

En el Perú, el proceso Fenton se ha utilizado en el tratamiento de aguas residuales de una refinería de petróleo⁶ y en efluentes procedentes de la industria textil^{8,9}. Sin embargo, hasta ahora no se ha utilizado este proceso en el tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios de nuestro país. Los lixiviados generados del relleno sanitario "Aguas de las Vírgenes" (RSAV), no reciben ningún tipo de tratamiento y cuando alcanzan su capacidad máxima, estos son recirculados mediante bombeo hacia el relleno sanitario, la cual agrava el problema en la época de lluvia. Además, tiene una antigüedad de más de 30 años y no tiene un sistema de impermeabilización del suelo, contaminando cuerpos de aguas subterráneos y poniendo en

peligro la salud de los habitantes de zonas aledañas. Por ello, los objetivos de este trabajo fueron determinar las características fisicoquímicas del lixiviado del RSAV, calcular su biodegradabilidad, para luego encontrar la dosis óptima de adición del reactivo Fenton y pH tanto para época de lluvia como para la de estiaje.

PARTE EXPERIMENTAL

Toma de muestras de lixiviados

Las muestras fueron colectadas del relleno sanitario “Agua de las Vírgenes” (RSAV), ubicado en Huancayo, Perú. Se realizaron dos muestreos de las pozas de almacenamiento de lixiviados en la época de lluvia (marzo 2014) y en la época de estiaje (junio 2014). De las tres pozas existentes, se tomaron muestras al azar y se homogenizaron para obtener un volumen de 25 litros de lixiviado para cada época de estudio. Para analizar la reproducibilidad, se tomaron muestras del relleno sanitario “El Edén” (RSE) en los mismos períodos de estudio.

Análisis de las muestras

Los lixiviados fueron pre-filtrados utilizando papel filtro 125 mm de diámetro (Whatman), con el fin de remover partículas grandes, restos orgánicos y para mantener la uniformidad de las muestras. Estas, fueron caracterizadas antes y después del tratamiento Fenton. Se determinaron los siguientes parámetros: pH, demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5), demanda química de oxígeno (DQO), alcalinidad, dureza, conductividad, sólidos totales (ST), turbidez, plomo (Pb) y cadmio (Cd). Para ello, se emplearon las técnicas establecidas por el *Standard Methods*¹⁰. Además, se utilizó un equipo de prueba de jarras con agitación donde se llevaron a cabo las reacciones.

Determinación de la dosis óptima

Para determinar la dosis óptima, se empleó el diseño Box - Behnken que contempla tres factores y tres niveles¹¹, para ello se utilizó el programa Statgraphics 5.1 Plus. Se evaluó el efecto de la combinación de tres variables independientes: sulfato ferroso, peróxido de hidrógeno y pH, codificados como X_1 , X_2 y X_3 (tabla 1). Cada variable se representó en tres niveles: un nivel alto (+), un nivel intermedio (0) y un nivel bajo (-). Como variable de respuesta se utilizó la remoción de contaminantes medidos como DQO.

Tabla 1. Diseño Box - Behnken de la dosis óptima de los reactivos Fenton

Variable independiente	Unidades	Símbolo	Código de Niveles		
			-	0	+
FeSO ₄	mg/L	X ₁	1000	1500	2000
H ₂ O ₂	mg/L	X ₂	800	1000	1200
pH	0 – 14	X ₃	2,5	3,0	3,5
VARIABLE DE RESPUESTA			DQO (mg O ₂ /L)		

Oxidación Fenton

Para estimar el valor óptimo de pH y la dosis óptima del reactivo de Fenton se realizaron 15 ensayos iniciales con dos réplicas en cada época de estudio (tabla 2). Cada variable se representó de la misma manera que en apartado anterior. El pH de la muestra (500 mL de lixiviado) fue medido utilizando el equipo pHmetro HANNA HI 22113. El pH se ajustó con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 , 96,6% p/p de pureza, ACS Fermont) y se adicionó sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 99% p/p de pureza, Merck), se homogenizó durante 5 minutos a 50 rpm, luego se disminuyó a 30 rpm y finalmente se adicionó peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 30% V/V, Merck), evitando la formación excesiva de espumas. Los valores de pH y la dosis del reactivo Fenton fueron aplicados de acuerdo a la matriz de experimentación (tabla 2).

Tabla 2. Matriz de experimentación Box Behnken para la aplicación del proceso Fenton

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	Plan de experimentación		
				FeSO ₄ (mg/L)	H ₂ O ₂ (mg/L)	pH
1	-	-	0	1000	800	3,0
2	-	+	0	1000	1200	3,0
3	+	-	0	2000	800	3,0
4	+	+	0	2000	1200	3,0
5	-	0	-	1000	1000	2,5
6	-	0	+	1000	1000	3,5
7	+	0	-	2000	1000	2,5
8	+	0	+	2000	1000	3,5
9	0	-	-	1500	800	2,5
10	0	-	+	1500	800	3,5
11	0	+	-	1500	1200	2,5
12	0	+	+	1500	1200	3,5
13	0	0	0	1500	1000	3,0
14	0	0	0	1500	1000	3,0
15	0	0	0	1500	1000	3,0

Se tomaron alícuotas de las muestras cada 20 minutos durante una hora. El pH se elevó a un valor de 7 con hidróxido de sodio (NaOH, 98,87% p/p de pureza, Loba Chemie). La reacción se detuvo con óxido de manganeso (Merck). Inmediatamente, 2 mL de los lixiviados se colocaron en un vial de análisis de DQO (Merck) y tras su agitación se ubicaron en un termostato Laviband ET108 a 150 °C durante dos horas. Transcurrido este tiempo, se efectuaron las lecturas correspondientes en un espectrofotómetro UV-VIS 1203 (Shimadzu) a una longitud de onda de 620 nm. A partir de estos valores se determinó el porcentaje de remoción de DQO.

Tiempo óptimo de contacto del reactivo de Fenton

Para el cálculo del tiempo de contacto, se tomaron los valores altos y bajos del reactivo Fenton según la tabla 1, con un pH ajustado a 3. Ambos niveles estudiados a una presión y temperatura ambiente. Alícuotas de los lixiviados fueron tomadas a 0, 20, 40 y 60 minutos. Luego el pH se ajustó a 7 con NaOH 5M y se agregó 0,5 g de MnO₂ que favoreció la precipitación del hierro y detuvo la reacción.

Índice de Biodegradabilidad (IB) de los lixiviados

El IB se obtuvo tras calcular el ratio de los valores de DBO_5 y DQO. Esta relación indicó qué fracción de la materia orgánica total existente en la muestra puede descomponerse biológicamente. Así, muestras fácilmente biodegradables presentan valores de $\text{IB} > 0,60$. Muestras parcialmente biodegradables presentan valores de IB entre 0,41 – 0,59 y aquellas con contenido orgánico persistente y que no son biodegradables presentan valores de $\text{IB} < 0,4$ ¹².

Porcentaje de remoción de DQO

El cálculo del porcentaje de remoción de $\text{DQO}_{\text{TOTAL}}$ se realizó con la siguiente fórmula:
Remoción de DQO (%) = $[(\text{DQO}_{\text{INICIAL}} - \text{DQO}_{\text{REMANENTE}}) / \text{DQO}_{\text{INICIAL}}] * 100$.

Los datos de remoción de DQO fueron analizados con el programa Statgraphics 5.1 Plus. El punto óptimo se calculó aplicando la metodología de Superficie de Respuesta (SR). Las medias se contrastaron utilizando el método de la diferencia mínima significativa, con un nivel de significación de $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica de los lixiviados crudos

En la tabla 3 se muestran los resultados de la caracterización inicial de los lixiviados del RSAV y RSE. En la época de estiaje se observa un incremento en todos los parámetros medidos en los lixiviados de RSAV, menos la DBO_5 que disminuyó ligeramente. Similares tendencias se observaron en los lixiviados de RSE. Esto podría explicarse por qué en el mes de marzo del 2014 se registró en Huancayo una precipitación acumulativa de 179,7 mm²¹, que propició una dilución de los lixiviados y por ende la disminución de las concentraciones de los contaminantes. Mientras que en época de estiaje, los lixiviados se concentraron por efecto de la evaporación, lo que influyó en el incremento del 30% de DQO, respecto a la época de lluvia en lixiviados de RSAV y del 22% en la muestra comparativa de RSE. Esto debido a que en junio del 2014 se registró 0,3 mm de precipitación acumulativa¹³. Sin embargo, los niveles de radiación solar fueron relativamente altos¹³ y propiciaron la evaporación de la humedad del relleno y por ende la concentración de los lixiviados generados. En general, los lixiviados del RSAV presentaron menores valores de DQO en ambas épocas de estudio en comparación con las del RSE, esto se debe a que este último es más joven que el estudiado.

Asimismo, no se observaron cambios importantes en el pH de los lixiviados entre ambas épocas de estudio, ya que la diferencia fue de 0,77 unidades para los lixiviados del RSAV y de 1,44 para los lixiviados del RSE. También, valores de pH comprendidos entre 6,5 y 8,8 han sido reportados previamente por Méndez y col.^{1,3} y Primo⁵.

Tabla 3. Composición fisicoquímica inicial de los lixiviados

Parámetro	Muestra de lixiviado			
	“Aguas de las Vírgenes”		“El Edén”	
	1	2	1	2
DBO ₅ (mg O ₂ /L)	328,50	306,00	8250	6909
DQO (mg O ₂ /L)	2221,87	3140,62	13187	16875
Dureza total (CaCO ₃)	1200	5680	6200	7100
Alcalinidad total (CaCO ₃)	1260	7360	5800	8880
Potencial de hidrógeno (pH)	7,40	8,17	6,62	7,86
Conductividad (μS/cm)	2400	16600	15700	33000
Sólidos totales (Unidades)	1214	9400	2335	9300
Turbidez (NTU)	1240	488,80	1600	10342,50
Plomo total (Pb total)	0,814	0,190	0,60	0,029
Cadmio total (Cd total)	0,0018	0,0218	0,00	0,00

1: época de lluvia, 2: época de estiaje

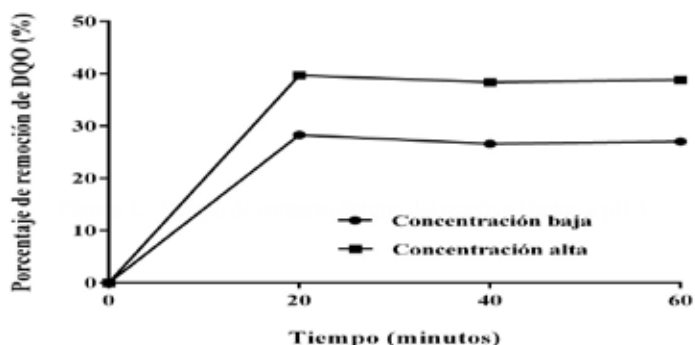
En la época de estiaje, la conductividad se incrementó en 85% y 52% en los lixiviados del RSAV y RSE, respectivamente, mientras que en época de lluvia sufrieron una gran dilución. Similares valores de conductividad obtuvieron Méndez y col.¹ y Escudero². Los parámetros de alcalinidad total, dureza total, turbidez y sólidos totales coinciden con los valores citados por Méndez y col.^{1,3} y Primo⁵. En cuanto al contenido de metales pesados en la época de lluvia, se observó que la presencia de plomo fue mayor en los lixiviados del RSAV y RSE (80% más que en época de estiaje). Mientras que en época de estiaje se observó el cadmio en pequeñas concentraciones en los lixiviados del RSAV. No obstante, este metal no fue detectado en los lixiviados del RSE. La presencia de estos metales es propia de los lixiviados que arrastran a su paso; sin embargo, la existencia de relaves mineros en las cercanías de dichos rellenos también podrían contribuir en el incremento de sus concentraciones, sobre todo durante el mes de marzo cuando los vientos favorecen su movilización.

Optimización del tiempo de contacto del reactivo de Fenton

En la tabla 4 se muestran los valores de remoción de DQO en dos niveles, bajo y alto. El nivel bajo del reactivo Fenton con FeSO₄ (1000 mg/L), H₂O₂ (800 mg/L) a pH 2,5 y el nivel alto del reactivo Fenton con FeSO₄ (2000 mg/L), H₂O₂ (1200 mg/L) a pH 3,5. Se observó que a partir de los 20 minutos los porcentajes de remoción muestran un comportamiento asintótico (figura 1) y conforme avanza el tiempo de contacto, estos porcentajes de remoción promedio de DQO presentaron un comportamiento constante. Por ello, se determinó como óptimo el tiempo de 20 minutos. Valores muy próximos también fueron reportados previamente por Méndez y col.^{1,3}.

Tabla 4. Corridas experimentales para el cálculo del tiempo de contacto óptimo del proceso Fenton.

Tiempo (min)	Muestra 1		Muestra 2	
	Nivel bajo		Nivel alto	
	DQO _{TOTAL}	Remoción (%)	DQO _{TOTAL}	Remoción (%)
0	2221,87	0,0	2221,87	0,0
20	1593,75	28,3	1340,62	39,7
40	1631,25	26,6	1368,75	38,4
60	1621,87	27,0	1359,38	38,8

**Figura 1.** Tiempo de contacto óptimo del reactivo Fenton a pH3

Condiciones óptimas de aplicación del proceso Fenton

En la figura 2 se muestran los porcentajes de remoción de DQO a las condiciones establecidas según el diseño experimental Box - Behnken para ambas épocas de estudio. Se realizó una corrida inicial con dos réplicas para minimizar el ruido experimental, haciendo un total de 45 ensayos para el período de experimentación. En época de lluvia como en la época de estiaje, se observaron tendencias similares y se detallan a continuación: *los experimentos 5, 7, 9 y 11 presentaron valores bajos de remoción de DQO, debido a que los valores de pH no fueron los óptimos, esto puede explicarse desde tres puntos de vista: primero, el $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})]^{+2}$ formado reaccionó lentamente con el H_2O_2 y produjo menos radicales $\text{OH}\cdot$; segundo, el efecto de barrido del H^+ sobre el $\text{OH}\cdot$ fue más importante a pH bajo y tercero, que el pH ácido inhibió la reacción entre el Fe^{+3} y el H_2O_2 ¹⁴. Valores de pH por encima de óptimo también obstaculizaron el proceso Fenton (figura 2). *Los experimentos 8, 10 y 12 muestran remociones aceptables que no están muy alejadas del valor óptimo, sin embargo, estos valores de pH son próximo a 4 se inicia el proceso Fenton de inhibición en fase homogénea¹⁴.

Las condiciones óptimas del proceso Fenton, para la época de lluvia y estiaje en lixiviados del RSAV, se calcularon con el software Statgraphics 5.1 plus, se seleccionó

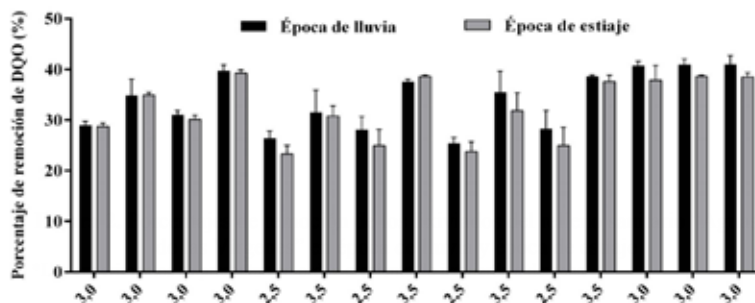


Figura 2. Porcentajes de remoción de los lixiviados del relleno sanitario "Aguas de las vírgenes" en épocas de lluvia y época de estiaje

*Los experimentos se presentan en orden creciente de izquierda a derecha

y se adecuó el diseño Box - Behnken. Se obtuvo una SR para la remoción de DQO_{TOTAL} como se muestra en la figura 3 (A y B). El comportamiento tridimensional en ambas épocas de estudio se ajustó a un modelo de segundo orden, lo que supone un punto óptimo del proceso Fenton sobre los lixiviados.

En la figura 4 (A y B), se muestran las proyecciones bidimensionales de la SR para la época de lluvia y de estiaje. Cada línea de contorno indicó un número infinito de combinaciones de las cantidades de reactivo de Fenton y pHs para la degradación de lixiviados.

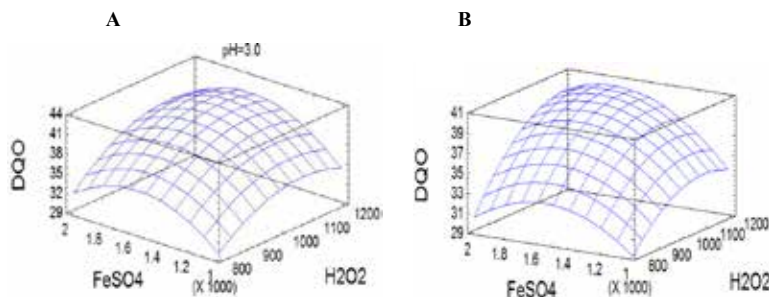


Figura 3. Superficie de respuesta estimada en lixiviados del relleno sanitario "Aguas de las Vírgenes" a pH 3 para época de lluvia (A) y época de estiaje (B)

Los puntos dentro de las elipses más pequeñas de la figura de contornos (figura 4A y 4B) representaron los valores óptimos de la aplicación del proceso Fenton. Para la época de lluvia correspondió a 1645,55 g/mL de sulfato ferroso, 1096,55 g/mL de peróxido de hidrógeno y 3,19 para el pH (figura 4A). Mientras que para la época de estiaje correspondió a 1788,61 mg/L de sulfato ferroso, 1180,83 mg/L de peróxido de hidrógeno y 3,26 para el pH (figura 4B). Los valores óptimos del pH en época de lluvia y estiaje fueron muy próximos al valor de 3 (tabla 5), reportado como el ideal por Méndez y col.¹ y Primo⁵.

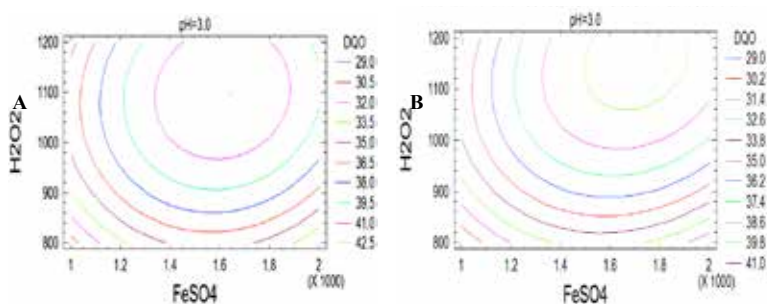


Figura 4. Contornos de superficie de respuesta estimada a pH 3 en los lixiviados del relleno sanitario “Aguas de las Vírgenes” en época de lluvia (A) y época de estiaje (B).

En época de estiaje se incrementó el requerimiento de los reactivos de Fenton en aproximadamente un 8% y 7% para el sulfato ferroso y peróxido de hidrógeno, respectivamente, con respecto a la época de lluvia, lo que hace suponer una mayor concentración de contaminantes recalcitrantes que demandan una mayor producción de radicales $\text{OH}\cdot$ favoreciendo su degradación.

Tabla 5. Optimización de los factores del proceso Fenton en época de lluvia y de estiaje.

Factor	Época de lluvia			Época de estiaje		
	Nivel inferior	Nivel superior	Óptimo	Nivel inferior	Nivel superior	Óptimo
FeSO_4 (mg/L)	1000	2000	1645,55	1000	2000	1788,61
H_2O_2 (mg/L)	800	1200	1096,55	800	1200	1180,83
pH	2,5	3,5	3,19	2,5	3,5	3,26

Siete de los efectos que influyen en el porcentaje de remoción de la DQO del RSAV en ambas épocas de estudio fueron estadísticamente significativos a un 95% de nivel confianza. Además, el R^2 ajustado en época de lluvia y estiaje fue 87,8% y 90,3%, respectivamente, esto indicó que la remoción de DQO depende fuertemente del pH, la concentración de sulfato ferroso y peróxido de hidrógeno, las interacciones y efectos cuadráticos, tal como se puede apreciar en el diagrama de Pareto de la figura 5A y 5B. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado (el efecto estimado dividido por su error estándar) y los efectos fueron significativos, ya superaron la línea vertical.

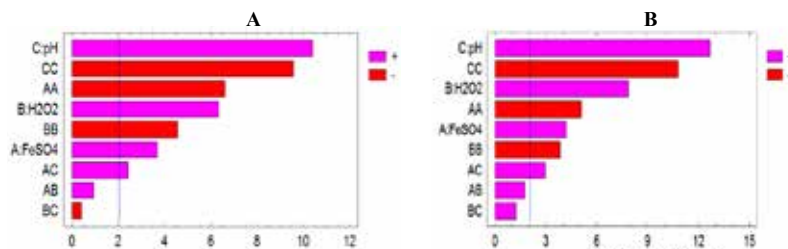


Figura 5. Diagrama de Pareto de los efectos de las variables para la remoción de DQO en época de lluvia (A) y época de estiaje (B).

De lo expresado anteriormente, se estableció que el pH fue el factor de gran importancia para el buen desempeño del proceso Fenton en época de lluvia y de estiaje, seguido por la adecuada dosificación de sulfato ferroso y peróxido de hidrógeno.

El modelo matemático que representó mejor el comportamiento del nuevo sistema para la época de lluvia es el siguiente (Ec. 1):

$$\text{DQO} = -325.742 + 0.031966 A + 0.166792 B + 157.183 C - 1.78 \cdot 10^{-5} A^2 + 6 \cdot 10^{-5} AB + 6.2667 \cdot 10^{-3} AC - 7.66667 \cdot 10^{-5} C^2 - 2.66667 \cdot 10^{-3} BC - 25.7333 C^2 \quad (\text{Ec. 1})$$

Mientras que para la época de estiaje, el modelo matemático del nuevo sistema fue el siguiente (Ec. 2):

$$\text{DQO} = -274.56 + 9.71667 \cdot 10^{-3} A + 9.76597 \cdot 10^{-2} B + 153.442 \cdot C - 1.26278 \cdot 10^{-5} A^2 + 1.05 \cdot 10^{-5} AB + 7.06667 \cdot 10^{-3} AC - 5.95486 \cdot 10^{-5} C^2 + 7.41667 \cdot 10^{-3} BC - 26.7944 C^2 \quad (\text{Ec. 2})$$

En estas ecuaciones, A, B y C representan al FeSO_4 , H_2O_2 y pH, respectivamente. No se observó la dispersión de los datos. Además, el modelo de regresión propuesto fue aceptable, pues el error estándar de la estimación presentó una desviación normal con residuos de 2,24 y 2,086 en época de lluvia y de estiaje, respectivamente. Por otro lado, el error absoluto de la media fue 1,52 y 1,39 en época de lluvia y de estiaje, respectivamente, considerándose aceptable para ambos períodos.

Tratamiento Fenton con los parámetros optimizados

Tras aplicar los parámetros optimizados, se observó una mejora en la mayoría de los parámetros fisicoquímicos de los lixiviados del RSAV tanto en época de lluvia como en época de estiaje (tabla 6).

Tabla 6. Composición fisicoquímica final de los lixiviados después del tratamiento Fenton optimizado

Parámetro	Muestra de lixiviado			
	"Aguas de las Vírgenes"		"El Edén"	
	1	2	1	2
DBO ₅ (mg O ₂ /L)	726,80	603,00	6734,00	3675,00
DQO (mg O ₂ /L)	1278,13	1834,10	6450,00	8043,75
Dureza total (CaCO ₃)	660,00	2600,00	3100,00	1660,00
Alcalinidad total (CaCO ₃)	920,00	5600,00	2150,00	2840,00
Potencial de hidrógeno (pH)	6,98	7,20	6,98	7,20
Conductividad (μS/cm)	6590,00	32100,0	25150,00	36780,00
Sólidos totales (Unidades)	590,00	5400,00	957,00	4900,00
Turbidez (NTU)	15,00	172,00	66,00	73,80
Plomo total (Pb total)	0,487	0,00	0,588	0,00
Cadmio total (Cd total)	0,00	0,00	0,00	0,00

1: época de lluvia, 2: época de estiaje

El cambio de pH (medio ácido) en época de lluvia, influyó en la disminución de la alcalinidad (27%), dureza total (45%), redujo el efecto tampón y la fuerza iónica de la solución, favoreciendo la floculación y precipitación de la materia coloidal presente en los lixiviados²⁵ y por ende mejoró el valor de la turbidez (98%). También se observó una disminución de los sólidos totales (51%), plomo (40%) y cadmio (100%). La disminución o eliminación total de la concentración de metales pesados puede explicarse por la presencia de carbono orgánico coloidal en los lixiviados, y cómo estos tienen la capacidad de adsorber altas concentraciones de metales en su superficie, pueden ser eliminados conjuntamente con los coloides cuando son floculados y precipitados¹⁵.

En época de estiaje también se observó importantes reducciones en la dureza total (54%), alcalinidad (24%), sólidos totales (43%), turbidez (65%) y la totalidad de los metales pesados. Además, la conductividad se incrementó en un 63% en época de lluvia y 37% en época de estiaje. Esto puede explicarse por el hecho de que para alcanzar los pHs óptimos se necesitó la adición de más ácido en los lixiviados lo que propició el incremento de este parámetro. Además, la sal de fierro adicionada durante el tratamiento y neutralización de los lixiviados a pesar de que fue removida en forma de lodos, aún se mantuvo los remanentes iónicos en la solución¹⁵, lo que pudo ocasionar el incremento de la conductividad.

Biodegradabilidad

En la tabla 7 se muestran los índices de biodegradabilidad antes y después del tratamiento Fenton en ambas épocas de estudio. En los lixiviados RSAV, los valores iniciales de IB tanto en época de lluvia y de estiaje fueron de 0,148 y 0,097, respectivamente.

Tabla 7. Índice de Biodegradabilidad (IB) antes y después de aplicar el proceso Fenton optimizado en época de lluvia y estiaje

Época	Lixiviado “Aguas de las Vírgenes”		Lixiviado “El Edén”	
	IB inicial	IB final	IB inicial	IB final
Lluvia	0,148	0,568	0,625	1,044
Estiaje	0,097	0,329	0,409	0,457

Este hecho aunado con el bajo contenido de DBO₅, en ambas épocas de muestreo, hace suponer la escasa presencia de materia biodegradable y persistente, existiendo la probabilidad de que se liberen grandes moléculas orgánicas recalcitrantes que proceden de los mismos residuos sólidos confinados². Similares valores de IB obtuvo Escudero² y observó que estos valores producían una inhibición del metabolismo microbiano en un proceso de oxidación biológico. Es por ello que en este estudio se optó por un tratamiento fisicoquímico para poder reducir la carga orgánica persistente no biodegradable.

Con respecto al RSE, en la época de lluvia el IB fue mayor a 0,6 lo que advirtió que eran lixiviados con material orgánico fácilmente biodegradable, mientras que en la época de estiaje el IB fue ligeramente mayor a 0,4, lo que indicó la presencia de material orgánico

parcialmente biodegradable, y por lo tanto la factibilidad de aplicar el proceso Fenton como post tratamiento. Sin embargo, tras la aplicación de los parámetros optimizados, el IB de los lixiviados del RSAV incrementó en 0,420 y 0,232 en época de lluvia y en época de estiaje, respectivamente. Si bien los IB mejoraron notablemente aún existe material orgánico parcialmente biodegradable en la época de lluvia y persistente en la época de estiaje. Esto podría estar relacionado con la presencia de ácidos húmicos altamente resistentes a la degradación biológica y la antigüedad del relleno sanitario. Los lixiviados del RSE presentaron valores de IB por encima de la unidad en época de lluvia, lo que hace referencia de que el contenido orgánico presente en este lixiviado es fácilmente biodegradable. No obstante, es parcialmente biodegradable en época de estiaje.

CONCLUSIONES

Se han observado importantes diferencias en las características fisicoquímicas del RSAV en ambas épocas. En época de estiaje hubo mayor concentración de contaminantes comparado con la época de lluvia, lo que refleja la influencia de las condiciones ambientales del lugar y la naturaleza de los residuos sólidos confinados en la composición del mismo. El tiempo de contacto óptimo fue 20 minutos. La metodología de superficie de respuesta indicó que en la época de lluvia, el pH óptimo fue 3,19 y las concentraciones óptimas de sulfato ferroso y peróxido de hidrógeno fueron 1645,55 mg/L y 1096.55 mg/L, respectivamente. Mientras que en la época de estiaje el pH óptimo fue 3,26 y las concentraciones óptimas de sulfato ferroso y peróxido de hidrógeno fueron 1788,61 mg/L y 1180,83 mg/L, respectivamente. El índice de biodegradabilidad de los lixiviados del RSAV mejoró notablemente tanto para la época de lluvia (IB = 0,568) como para la de estiaje (IB = 0,329), sin embargo, dichos índices sugieren que el proceso Fenton debe ser optimizado aún más para obtener un lixiviado con mejores características biodegradables.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Méndez RI, Castillo ER, Sauri MR, Quintal CA, Giacomán G, Jiménez B. Comparación de cuatro tratamientos fisicoquímicos de lixiviados. *Rev Int Contam Ambient.* 2009; 25(3):133-145.
2. Escudero CJ. Tratamiento de lixiviados provenientes de un vertedero de residuos sólidos urbanos mediante la aplicación de sistemas fisicoquímicos a escala laboratorio. [tesis de maestría]. Guanajuato: Universidad de Guanajuato; 2012.
3. Méndez RI, García RB, Castillo ER, Sauri MR. Tratamiento de lixiviados por oxidación Fenton. *Ingeniería e Investigación.* 2010; 30(1): 80 – 85.
4. Hermosilla D, Cortijo M, Huang CP. Optimizing the treatment of landfill leachate by conventional Fenton and photo-Fenton processes. *Sci Total Environ.* 2009; 407: 3473–3481.
5. Primo Martínez O. Mejoras en el tratamiento de lixiviados de vertedero de RSU mediante procesos de oxidación avanzada. [Tesis Doctoral]. Santander: Universidad de Cantabria; 2008.

6. Salas G, Ale N. Tratamiento de las aguas residuales de una refinería de petróleo por oxidación avanzada (AOX), usando el reactivo fenton (H_2O_2/FE^{2+}). *Rev Per Quim Ing Quim.* 2008; 11(2): 12-18.
7. Bianco B, Michelis ID, Vegliò F. Fenton treatment of complex industrial wastewater: optimization of process conditions by surface response method. *J Hazard Mater.* 2011; 186: 1733–1738.
8. Salas G. Tratamiento por oxidación avanzada (reacción fenton) de aguas residuales de la industria textil. *Rev Per Quim Ing Quim.* 2010; 13 (1): 30-38.
9. Gamarra C, La Rosa-Toro A. Decoloración del anaranjado de metilo empleando el sistema fenton. *Rev Soc Quím Perú.* 2014; 80 (1): 24-34.
10. American Public Health Association, APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* 18th Ed. Washington: American Public Health Association; 1992.
11. Montgomery DC. *Diseño y análisis de experimentos.* 2ª Edición. México D.F.: Editorial Limusa Wiley; 2005: 1- 459.
12. Blanco Jurado J. *Degradación de un efluente textil real mediante procesos Fenton y Foto-Fenton.* [Tesis de Maestría]. Barcelona: Universidad Politécnica de Catalunya; 2009.
13. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología Región Junín. SENAMHI; 2014.
14. Deng Y, Englehardt JD. Treatment of landfill leachate by the Fenton process. *Water Res.* 2006; 40: 3683 – 3694.
15. Giácoman VG, Quintal Franco C. Influencia del cambio en el potencial de hidrógeno (pH) en la disminución de contaminantes y metales pesados del lixiviado de un relleno sanitario. XXX Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental – AIDIS; 2006 Nov 26 – 30; Punta del Este, Uruguay.

DESARROLLO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO CUATERNIZADO Y ENTRECruzADO PARA LA ADSORCIÓN DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)

José L. Cconislla Bello^a, Christian Jacinto^b, Ily Maza, Martha Jahuirra, Alejandra Pando, Holger Mayta, Ana Valderrama

RESUMEN

Las micropartículas de quitosano entrecruzado (QE1%, QE5%) se prepararon mediante reticulación con el glutaraldehído (GL). Las micropartículas de quitosano cuaternizado (QC) se prepararon mediante cuaternización del grupo amino del quitosano con cloruro de glicidil trimetil amonio (CTAG). Ambas micropartículas de quitosano se caracterizaron utilizando distintas técnicas como la espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (DRX), análisis termogravimétrico (TGA), análisis termogravimétrico diferencial (DTG) y microscopía electrónica de barrido (SEM). La cantidad de ADN adsorbida en las micropartículas se determinó por espectroscopía UV en un equipo NanoDrop2000 obteniéndose resultados satisfactorios. De las isotermas de adsorción evaluadas, el modelo de Freundlich se adapta al proceso de adsorción de ADN.

Palabras clave: cuaternización, entrecruzamiento, quitosano, ADN.

DEVELOPMENT OF QUATERNIZED AND CROSSLINKED MICROPARTICLES OF QUITOSANE TO THE DEOXYRIBONUCLEIC ACID (AND) ADSORTION

ABSTRACT

The crosslinked chitosane microparticles (QE1%, QE5%) were prepared by reticulation with glutaraldehyde (GL). The quaternized chitosane microparticles (QC) were prepared by quaternization of the chitosane amine group with glycidyl trimethyl ammonium (CTAG). The microparticles were characterized and subjected to adsorption tests. To characterization of chitosane microparticles different techniques were used like FTIR spectroscopy, DRX, TGA, DTG and SEM. The DNA quantity adsorbed in the microparticles was determined by uv-visible spectroscopy in a NanoDrop2000 equipment getting very encouraging results. The

^a Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Rímac
Lima 25, Perú, jconisllab@uni.com

^b Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares,
Facultad de Ciencia y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Langmuir and Freundlich adsorption models were applied to describe the balance isotherms. The Freundlich model adapts with the experimental data.

Key words: quaternization, crosslinking, chitosane, DNA.

INTRODUCCIÓN

Los polímeros naturales, tales como celulosa, agarosa, dextrano y quitosano se han utilizado con frecuencia como material absorbente. El quitosano es un polímero orgánico que existe ampliamente en la naturaleza, es un polisacárido hidrófilo y biocompatible. Sus grupos amino e hidroxilo proporcionan sitios activos de reacción, para el fácil acoplamiento de diversos grupos funcionales e introducir propiedades deseadas. El quitosano natural ha sido modificado por varios métodos (ya sea física o químicamente) con el fin de mejorar la capacidad de adsorción, se han realizado diferentes tipo de reacciones, como por ejemplo formación de policomplejos, de entrecruzamiento y cuaternización (alquilación exhaustiva del grupo amino).¹

Las muestras de orina se han constituido en una alternativa no invasiva de obtención de ADN para la realización de diagnósticos sensibles y específicos para múltiples enfermedades, dentro de las cuales son de gran interés las infecciosas y parasitarias, entre las que se incluyen: malaria, toxoplasmosis, amebiasis, trichomoniasis, leishmaniasis, tripanosomiasis. Es una técnica muy importante, aunque presenta algunas desventajas debido a que el material genético contenido está presente en bajas concentraciones no detectable por métodos convencionales². La alternativa más plausible es el uso de material polimérico como el quitosano, el cual, debido a la presencia de grupos amino en la cadena polimérica y mediante su modificación química, puede incrementar la eficiencia de sus uniones con el ADN.

En los últimos años se ha demostrado que el quitosano es un potencial portador del gen policationico (ADN), este polisacárido biodegradable se une eficazmente al ADN en solución salina o solución de ácido acético protegiéndolo de la degradación por nucleasas. Varios derivados de quitosano han sido preparados en base a las reacciones con los grupos amino libres. Por ejemplo, el quitosano trimetilada se prepara con diferentes grados de cuaternización aumenta la solubilidad del quitosano a pH neutro, el quitosano / ADN Polyplex se sintetiza para la transferencia genética³. Todos estos estudios señalan la versatilidad y la promesa del quitosano como un portador de gen (ADN) el cual se ha demostrado.

Se han desarrollado varios modelos de equilibrio para describir la relación de las isothermas de adsorción. Ningún modelo ha demostrado ser aplicable de manera general. Sin embargo, los dos modelos más usados en la literatura son el de Langmuir y el de Freundlich.

El modelo de Langmuir viene representado por la ecuación:

$$q_e = \frac{Q^0 b C_e}{1 + b C_e} \quad (1)$$

Donde:

Q° : es la concentración de adsorbato por peso unitario de adsorbente que forma una monocapa completa en la superficie, es decir, la capacidad límite de adsorción; y b : una constante del modelo, también llamada coeficiente de adsorción, que se encuentra relacionada con la entalpía de adsorción.

La ecuación (1) se puede linealizar, como se muestra a continuación:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{Q^{\circ}} + \frac{1}{bQ^{\circ}} \frac{1}{C_e} \dots (2)$$

La ecuación del modelo de Freundlich tiene la forma general:

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \dots (3)$$

Donde:

K_F y n : son constantes características del sistema. Este es un modelo empírico, aunque se admite que K_F es una indicación aproximada de la capacidad de adsorción y $1/n$: de la intensidad de adsorción.

Los datos experimentales se suelen ajustar usando la fórmula logarítmica de la ecuación (3):

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \dots (4)$$

De manera que, según la ecuación (4), al representar $\log q_e$ frente a $\log C_e$, se obtendrá una línea recta de pendiente $1/n$ y ordenada en el origen $\log K_F$.

En este trabajo se busca la preparación y la caracterización de las micropartículas de quitosano modificado: quitosano entrecruzado y quitosano cuaternizado. La importancia de realizar este trabajo se basa en la contribución al desarrollo de preparar posibles micropartículas de quitosano modificado y aplicarlas para la adsorción de ADN y poder aportar en el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas desde muestras no invasivas (orina).

PARTE EXPERIMENTAL

Métodos de preparación de adsorbentes

Los tipos de quitosano modificado fueron preparados a partir del quitosano comercial (Grado de Desacetilación (G.D) = 72,49% y Peso Molecular (P.M) = 498 KDa). Para la preparación de QE1% y QE5% con GL se disolvieron 2g de quitosano en 150mL de ácido acético al 2% se agregaron distintas proporciones de GL (1% y 5%, respectivamente) se agitó hasta obtener un gel y luego se deja reposar por aproximadamente cuatro horas. Seguidamente, se realizan varios lavados con agua ultrapura para neutralizar y eliminar las impurezas, se liofiliza, muele y tamiza (malla N°100) para obtener un polvo fino.

Para la preparación de las micropartículas QC se disolvieron 2g de quitosano en 20mL de agua ultrapura, se agregó 3mL de CTAG bajo agitación a 60 °C por 24 h. El producto de la reacción fue precipitado en 150mL de acetona, luego filtrado y secado a 60 °C. Seguidamente pasa por una molienda y se tamiza con malla N° 100 para obtener un polvo fino.

Estudio Isoterma de la adsorción de ADN

Todos los ensayos de adsorción se llevaron a cabo a temperatura de ambiente y se trabajó con ADN plasmídico. Las lecturas de concentración de ADN se determinaron en un equipo NanoDrop 2000, en cada caso se utilizó una determinada masa del adsorbente (3, 6 y 25mg) y se puso en contacto con 200, 300 y 500 mL de solución de ADN a diferentes concentraciones. La adsorción de ADN se estudió en el rango de 5 a 400 ng/μL a un pH≈7, después de mantener en agitación a 350 rpm por 30 min, se centrifugó para separar las dos fases. Se midió la concentración de ADN presente en la solución remanente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los materiales:

Análisis e identificación de grupos funcionales por FTIR

Los grupos funcionales presentes en el quitosano y quitosano modificado (QE1%, QE5% y QC) fueron identificados empleando un Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) Modelo Shimadzu-1800, en un rango de 4000 a 500 cm⁻¹.

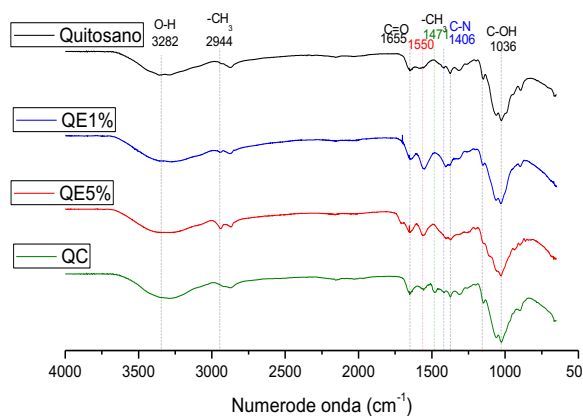


Figura 1. Espectro FTIR de quitosano, QE y QC

El resultado obtenido es consistente con muchos estudios anteriores⁷, que han demostrado la diferencia en el perfil FITR del quitosano y QE. Los picos de quitosano en 1363 cm^{-1} y 1155 cm^{-1} desaparecidos pueden indicar haber sido limitados por el glutaraldehído que reticula al quitosano de igual forma la aparición del pico a 1550 cm^{-1} puede ser también atribuida al proceso de reticulación. De hecho, Ramachandran *et al.*⁸ encontraron un nuevo pico agudo a 1610 cm^{-1} que representa las vibraciones de tensión de C-N en la base de Schiff formada por la reacción de glutaraldehído y quitosano, en nuestro caso ese pico se observa desplazado a 1650 cm^{-1} . Otros autores encontraron esta señal en 1664 cm^{-1} y 1660 cm^{-1} .

También se observa en la comparación de los espectros FTIR del QC que se evidencia un nuevo pico intenso a 1471 cm^{-1} , probablemente debido a los grupos metilo del amino cuaternario formado por la cuaternización del quitosano con CTAG. Estos resultados son consistentes con estudios anteriores¹⁰. La formación del producto QC, se da por el ataque nucleofílico del grupo amino ($-\text{NH}_2$) del quitosano al CTAG (cuaternizante), donde se produce la ruptura del epóxido que forma parte de la estructura del CTAG.

Análisis por DRX

El quitosano presenta dos formas cristalinas distintas debido a su polimorfismo, los patrones de difracción representan las diferentes mezclas de estas dos formas. Los picos de difracción en el entorno al ángulo $2\theta = 9^\circ$, $2\theta = 10^\circ$, $2\theta = 19^\circ$ y $2\theta = 20^\circ$ observados en el figura 2 son característicos del quitosano y corresponden a resultados publicados anteriormente.¹¹

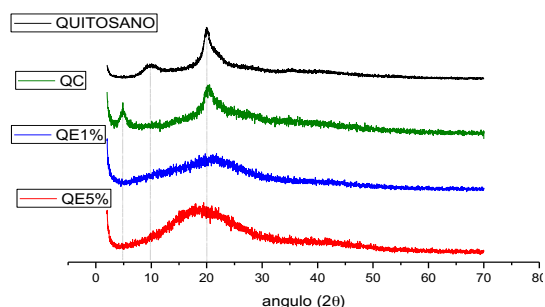


Figura 2. Patrones DRX de quitosano, QE y QC

Al comparar los patrones de difracción entre el quitosano y el quitosano entrecruzado QE1%, QE5% se observa picos característicos del quitosano que desaparecen, observando únicamente el pico $2\theta = 21^\circ$ algo ensanchado. Esta diferencia corrobora la reacción de entrecruzamiento entre el quitosano y el GL. El amorfismo del pico de QE (QE1% y QE5%) pone en evidencia que el índice de cristalinidad del quitosano disminuye después de la reticulación con GL; esto se atribuye a los fuertes enlaces de hidrógeno del grupo amino, los cuales, al ser sustituidos, destruyen eficazmente la regularidad de la estructura del quitosano original, dando como resultado la formación de una estructura amorfa, también se observa que al aumentar la proporción de GL evidenciamos que la intensidad y la anchura del pico están aumentando con lo cual el grado de amorfismo también aumenta¹¹.

Por otro lado, al comparar el patrón de difracción del quitosano y QC, se observan dos picos $2\theta = 5^\circ$ y 20° donde el pico $2\theta = 20^\circ$ presenta un ensanchamiento y ya no se observa el pico $2\theta = 9,5$ del quitosano, pero sí un pico nuevo a $2\theta = 5^\circ$. La interacción del grupo CTAG con el grupo amino del quitosano originaría una posible disminución del índice de cristalinidad haciendo la estructura más amorfa y la presencia del nuevo pico $2\theta = 5^\circ$ en el QC puede ser una evidencia de la formación del grupo amino cuaternario¹².

Análisis TGA y DTG

La curva calorimétrica del quitosano (figura 3.a) nos manifiesta tres eventos térmicos. El primer evento está relacionado con la pérdida de humedad que se da entre 60 y 110°C debido a la evaporación del agua, el segundo evento podría tratarse de la despolimerización con una máxima pérdida de peso, la cual se manifiesta entre 220 y 300°C debido a la degradación de las cadenas principales del quitosano (ruptura de los enlaces C-O-C) además de la separación de grupos aceto, y el tercer evento podría tratarse de la pirolisis, el cual se da por la descomposición del material orgánico final.

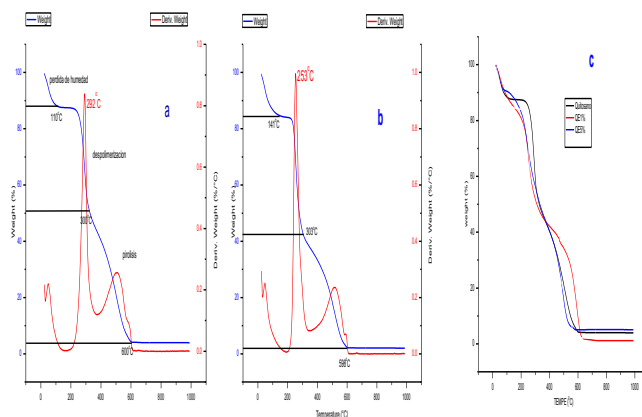


Figura 3. a) TGA y DTG de quitosano b) TGA y DTG QC c) TGA comparativo Q, QC, QE

Los termogramas TGA y DTG del quitosano y el QC (figura 3 a y b) nos muestran una diferencia en su temperatura de máxima velocidad de descomposición (T_{\max}). Esta temperatura es mayor para el quitosano en comparación con el QC, probablemente debido a que el quitosano presenta mayor índice de cristalinidad evidenciado en los difractogramas DRX y en los análisis calorimétricos diferenciales de barrido (DTG). También podemos evidenciar que las curvas calorimétricas del quitosano, QE, y QC tienen en común la manifestación de tres eventos térmicos; sin embargo, es el segundo evento el que muestra una diferencia en el valor de T_{\max} , esto se debe considerar en estos tres polímeros.

Esta diferencia de la cristalinidad se refleja en la estabilidad térmica, puesto que un compuesto, al poseer mayor cristalinidad, su estructura molecular será más rígida y por consiguiente se

necesita mayor energía para que se pueda descomponer. La disminución en la temperatura de descomposición en el QC se puede atribuir a la disminución en la estabilidad térmica como consecuencia de la interacción de los grupos amino del quitosano. Otra observación se da entre el quitosano y el QE por una diferencia muy notoria en sus termogramas. El QE se observa que es menos estable térmicamente pues inicia con la pérdida de peso alrededor de los 130 °C dando una descomposición multietapa, en donde los productos intermedios son inestables, esto se puede atribuir al entrecruzamiento de los grupos amino del quitosano y el GL, también la baja cristalinidad del QE es una evidencia más de la baja estabilidad térmica, pues los difractogramas DRX nos muestran que la estructura del QE tiene un grado de cristalinidad muy pobre¹³.

Isotermas de adsorción de ADN

La figura 4 muestra las isotermas que representan la relación de las capacidades de adsorción de ADN (q) expresado en μg de ADN retenido por gramo de quitosano o quitosano modificado (QE y QC) en agua ultrapura. Teniendo en cuenta las razones de interacción se aprecia que el comportamiento de las isotermas es ascendente hasta una concentración aproximada que varía de acuerdo al tipo de adsorbente (quitosano, QE y QC).

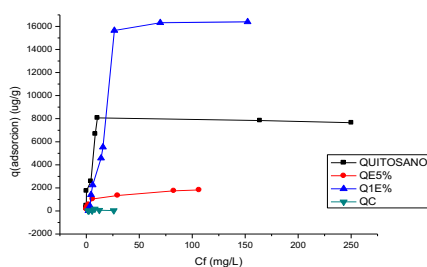


Figura 4. Isotermas de adsorción Quitosano, QE y QC

Los análisis de las muestras para la construcción de las isotermas se hicieron a temperatura de ambiente a un $\text{pH} \approx 7$. Estos resultados muestran que el QE1% es el que presenta mayor capacidad de adsorción de ADN de toda la serie, con un valor máximo de $q = 15755,3 \mu\text{g/g}$ (tabla 1). Esta variación en la capacidad de sorción entre QE1% y QE5% está relacionada con la variación de la superficie de los sorbentes, es interesante observar que las isotermas para los polímeros (Quitosano, QE1%, QE5% y QC) varían considerablemente; de acuerdo con la tabla 1, esto puede ser atribuido a propiedades como el peso molecular y la polidispersidad del polímero de partida. También los QE (QE1% y QE5%) pueden tener una mayor porosidad textural que estaría relacionado al contenido de glutaraldehído; por otro lado, los efectos de hidratación contribuyen al sorbente, pues presentan una mayor hinchazón que influirá en la superficie dando una mayor accesibilidad del sorbente hacia los adsorbatos en los dominios de los microporos superficiales y sitios de adsorción accesibles⁶.

Casi todas las isotermas presentan un comportamiento inicial ascendente evidente a excepción de la muestra QC. Inicialmente, se planteó la hipótesis que el QC tendría mayor sorción debido a que es un policomplejo⁴, esto debido a que la interacción ADN-QC se da por orígenes electrostáticos, los cuales son muy sensibles a variaciones de pH y concentraciones⁵.

Tabla 1. Valores máximos de q de sorción para quitosano QE y QC.

Nombre	q(µg/g)
quitosano	8030,83
QE1%	15755,3
QE5%	1981,21
QC	141,61

Modelos de isotermas de adsorción

La isoterma de adsorción indica cómo las moléculas de adsorbato (ADN) interactúan con el adsorbente (micropartículas de quitosano) en equilibrio en fase líquida como una función de la concentración de adsorbato. En este estudio de equilibrio los datos obtenidos para la adsorción de ADN en QE fueron los mejores, analizados con los modelos de isotermas de Langmuir y Freundlich.

La forma lineal de la ecuación isoterma de Langmuir se da como:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{Q^0} + \frac{1}{bQ^0} \frac{1}{c_e} \dots\dots(2)$$

Modelos de isotermas de adsorción

La isoterma de adsorción indica cómo las moléculas de adsorbato (ADN) interactúan con el adsorbente (micropartículas de quitosano) en equilibrio en fase líquida como una función de la concentración de adsorbato. En este estudio de equilibrio los datos obtenidos para la adsorción de ADN en QE fueron los mejores, analizados con los modelos de isotermas de Langmuir y Freundlich.

La forma lineal de la ecuación isoterma de Langmuir se da como:

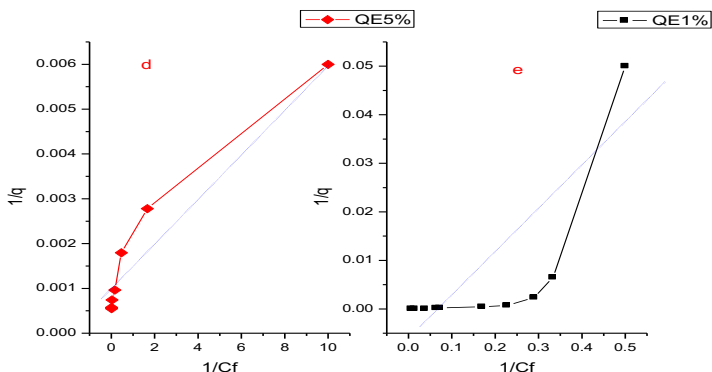


Figura 5. Linealización de Langmuir

Sin embargo, el modelo de Freundlich se ajustó con mayor eficiencia, como se puede ver en la figura 6. Los datos experimentales cumplen con mayor aproximación con lo predicho por la ecuación (4) la cual describe mejor la adsorción sobre superficies heterogéneas y confirman lo que indicaba la figura 4. Se podría afirmar que no existió influencia de la concentración inicial de sustrato en el sistema estudiado bajo las condiciones de trabajo consideradas, ya que todos los puntos caen aproximadamente sobre una misma recta.

La ecuación de la isoterma de Freundlich se muestra a continuación en su forma lineal:

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \dots\dots (4)$$

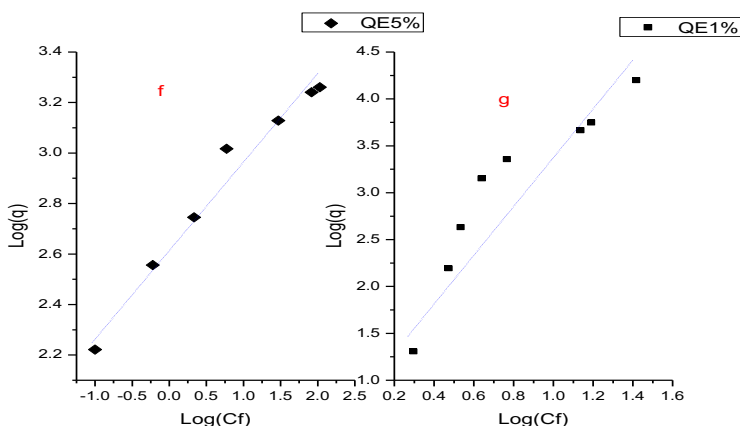


Figura 6. Linealización Freunlich

Tabla 2. Parámetro de los modelo de equilibrio de adsorción de ADN en QE

Modelo de equilibrio	Parámetro	QE1%	QE5%
Isoterma Langmuir	b (L/mg)	0,05072	0,2
	Q ⁰ (μg/g)	1428,57	1000
	r ²	0,6432	0,9289
	R _L	0,046	0,012
Isoterma Freundlich	K _F ⁰ (L/g)	51,191	421,405
	n	0,5654	2,946
	r ²	0,8892	0,9724

En este estudio del equilibrio de adsorción la tabla 2 nos muestra los datos obtenidos para la adsorción de ADN en micropartículas de QE1% y QE5%, considerando los modelos de isothermas de Langmuir y Freundlich.

La isoterma de Langmuir es frecuentemente evaluada por un factor de separación, R_L , que se define como sigue:

$$R_L = \frac{1}{1 + bC_0} \dots \dots (5)$$

Donde C_0 en este caso es la concentración de soluto inicial más alta. El valor del factor de separación indica el tipo de isoterma y la naturaleza del proceso de adsorción. Considerando el valor R_L la adsorción puede ser desfavorables ($R_L > 0$), lineales ($R_L = 1$), favorables ($0 < R_L < 1$) o Irreversible ($R_L = 0$). En los resultados observamos que los valores de R_L (tabla 2) para QE1% y QE5% son favorables, pero los gráficos de linealidad (gráfico 5) son desfavorables.

La isoterma de Freundlich, considerada empírica, describe mejor la adsorción en superficies heterogéneas. Los parámetros de la ecuación linealizada (ecuación 4) donde K_F (l / g) es constante de Freundlich y “n” es exponente de Freundlich se determinan a partir de un registro logarítmico de la capacidad de sorción versus logaritmo de la concentración en el equilibrio, C_e , representados en la tabla 2. El valor de r^2 nos muestra mejores resultados de linealidad para QE1% y QE5% (gráfico 5) y los valores de K_F son valores no exactos de la capacidad de adsorción.

Efecto del porcentaje de GL en el adsorbente

Los resultados de los experimentos con diferentes porcentajes de GL en el adsorbente se presentan en la figura 4 (QE1% y QE5%), un aumento en el porcentaje de GL en el adsorbente disminuye la capacidad de sorción. La cantidad de adsorbente modificado fue tres miligramos en ambos casos, se trabajó a las mismas condiciones, en QE1% aumenta la captación de ADN con respecto al QE5%. Hay una gran probabilidad que todos los sitios activos sobre la superficie adsorbente estén ocupados y un aumento de la cantidad de GL disminuye la adsorción de ADN.

Microscopía electrónica superficial (SEM)

La figura 7 presenta las micrografías SEM que ilustra la morfología superficial de las micropartículas Qitosano, QE1% y QE5%. En general, este resultado indica claramente que existe una diferencia en la morfología superficial entre quitosano y QE. De hecho, en comparación con la morfología suave, densa y plana del quitosano la del QE tiene una superficie porosa y poco áspera (figura 1 (QE1% y QE5%)). Estos resultados deben atribuirse al entrecruzamiento y al grado de desacetilación que son los que influyen en el tamaño y la morfología superficial del QE, todo esto es consistente con estudios anteriores¹⁴.

De igual forma, se puede observar la diferencia en la morfología superficial QE1% y QE5%, debido al porcentaje de entrecruzamiento con glutaraldehído, este entrecruzante puede aumentar la rugosidad de la superficie de QE aumentando el porcentaje de glutaraldehído,

lo que indica que la reacción ha tenido lugar en la superficie. Además, la estructura porosa de QE puede ofrecer más sitios de adsorción para adsorbatos, que generalmente apoyan el hecho que el quitosano entrecruzado con glutaraldehído ha sido ampliamente estudiado en la absorción de metales pesados¹⁵. Además, QE 5% con una superficie muy rugosa y una estructura de poros más abiertos podría suponer que es favorable para interactuar con el ADN a cierto punto, debido a que el mayor entrecruzamiento y la rugosidad de la superficie pueden evitar la interacción del adsorbato con el adsorbente, lo que puede explicarse con los resultados de las isoterms de adsorción.

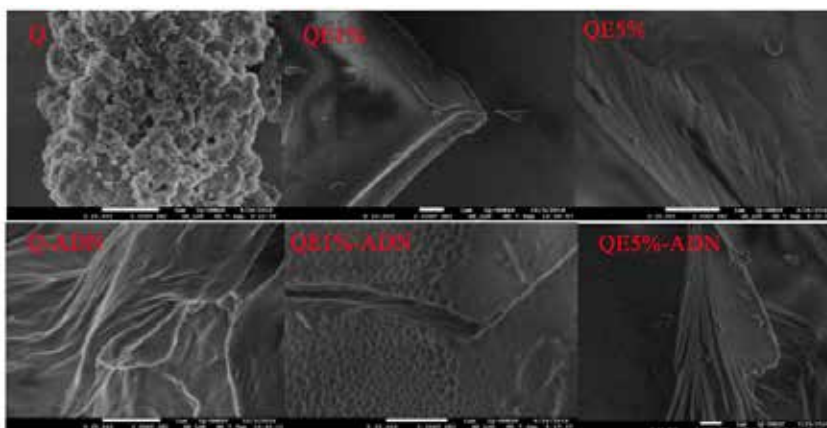


Figura 7. Imágenes SEM comparativas micropartículas de quitosano-ADN, QE1%-ADN y QE5%-ADN, aumento x10000 y x25000.

En la figura se compara las micropartículas quitosano, QE1% y QE5% con y sin ADN, se puede evidenciar que la morfología superficial de las micropartículas sufren cambios, una posible evidencia de que el ADN está siendo adsorbido por estas en la superficie. También se observa en la imagen SEM de quitosano-ADN que el cambio de la morfología es muy evidente, una posible explicación a esto es que los grupos amino del quitosano interactúan con el ADN, aglomerando las micropartículas de quitosano. En QE1%-ADN también se puede evidenciar el cambio en la morfología superficial evidenciando la posible adsorción de ADN, esto puede estar generando una mayor rugosidad de la superficie inicial de QE1%, lo mismo se evidencia para QE5%-ADN.

CONCLUSIONES

Se prepararon diferentes tipos de quitosano y quitosano modificados (QE1%, QE5%, y QC) partiendo de quitosano comercial, los cuales se caracterizaron por diferentes técnicas FTIR, DRX, TGA, DTG y SEM, estos resultados fueron consistente con la literatura.

Las pruebas de adsorción demostraron que las micropartículas de QE1% adsorben el ADN en mayor cantidad. Considerando la capacidad de sorción de 15,76 mg ADN/g QE 1% El proceso de adsorción de ADN se aproxima al modelo de isoterma de Freunlich, el cual describe mejor la sorción en superficies heterogéneas.

AGRADECIMIENTO

INNOVATE PERU-118-PNICP-PIAP-2015.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yazdani-Pedram M, Retuert J, Quijada R. Hydrogels based on modified chitosan, 1. Synthesis and swelling behavior of poly(acrylic acid) grafted chitosan. *Macromol Chem Phys.* 2000;201(9):923-930.
2. Spanos A, Theocharis G, Karageorgopoulos DE, Peppas G, Fouskakis D, Falagas ME. Surveillance of community outbreaks of respiratory tract infections based on house-call visits in the metropolitan area of Athens, Greece. *PLoS One.* 2012;7(8):e40310. doi: 10.1371/journal.pone.0040310.
3. Layek B, Singh J. Chitosan for DNA and gene therapy. *Chitosan Based Biomaterials.* 2013; 2: 209-244.
4. Bordi F, Chronopoulou L, Palocci C, Bomboi F, Di Martino A, Cifani N, et al. Chitosan–DNA complexes: Effect of molecular parameters on the efficiency of delivery. *Colloids Surface A.* 2014;460:184-90.
5. Oskolkov NN, Potemkin II. Complexation in asymmetric solutions of oppositely charged polyelectrolytes: Phase diagram. *Macromolecules.* 2007; 40(23):8423-8429.
6. Wilson LD, Mohamed MH, Headley JV. Surface area and pore structure properties of urethane-based copolymers containing β -cyclodextrin. *J Colloid Interface Sci.* 2011;357(1):215-222.
7. Yao W, Jiao Y, Luo J, Du M, Zong L. Practical synthesis and characterization of mannose-modified chitosan. *Int J Biol Macromol.* 2012;50(3):821-825.
8. Ramachandran S, Nandhakumar S, Dhanaraju MD. Formulation and characterization of glutaraldehyde cross-linked chitosan biodegradable microspheres loaded with famotidine. *Trop J Pharm Res.* 2011;10:309–316.
9. Knaul JZ, Hudson SM, Creber KAM. Crosslinking of chitosan fibers with dialdehydes: Proposal of a new reaction mechanism. *J Polym Sci Pol Phys.* 1999;37:1079–1094.
10. Zhang W, Sun C, Zhao Y, Lu X. One-pot synthesis and characterization of cross-linked quaternized chitosan microspheres as protein adsorbent. *Int J Biol Macromol.* 2011;49(4):688-92.
11. Souza BWS, Cerqueira MA, Martins JT, Casariego A, Teixeira JA, Vicente AA. Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings. *Food Hydrocolloid.* 2010;24(4):330-5.
12. Tang R, Zhang Y, Zhang Y, Yu Z. Synthesis and characterization of chitosan based dye containing quaternary ammonium group. *Carbohydr Polym.* 2016;139:191-6.
13. Corazzari I, Nistico R, Turci F, Faga MG, Franzoso F, Tabasso S, et al. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polym Degrad Stabil.* 2015; 112:1-9.

14. Mirzaei BE, Ramazani SAA, Shafiee M, Danaei M. Studies on glutaraldehyde crosslinked chitosan hydrogel properties for drug delivery systems. *Int J Polym Mater.* 2013; 62:605-611.
15. Suguna M, Kumar NS, Reddy AS, Boddu VM, Krishnaiah A. Biosorption of lead (II) from aqueous solution on glutaraldehyde cross-linked chitosan beads. *Can J Chem Eng.* 2011;89:833-843.

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE INMOVILIZACIÓN DE LIPASA PRODUCIDA POR *Marinobacter sp* CH27 EN OCTADECILO-SEPABEAD

Yadira Fernández Jeri^a, Amparo I. Zavaleta^a, Ana María Muñoz Jáuregui^b

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue optimizar el proceso de inmovilización de la lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27 en el soporte hidrofóbico octadecilo-sepabead por adsorción interfacial utilizando el diseño experimental Box-Behnken a 3 factores y 3 niveles con 12 experimentos y 3 réplicas en el punto central. Las variables y los niveles seleccionados fueron: fuerza iónica (2,5; 5,0 y 10,0 mM), tiempo (30, 60 y 120 min) y pH (6,0; 7,0 y 8,0) y las variables respuestas fueron la actividad de la enzima inmovilizada y el porcentaje de inmovilización. Los parámetros óptimos del proceso de inmovilización fueron: pH 6,62; 30 min y fuerza iónica 10 mM. Luego de ajustar los parámetros al modelo polinomial cuadrático, la actividad de lipasa inmovilizada fue de 11,16 U/g soporte con 81,50 % y 74,0 % de actividad relativa y rendimiento de inmovilización, respectivamente.

Palabras clave: Lipasa, *Marinobacter sp*, inmovilización, octadecilo sepabead, metodología superficie respuesta

OPTIMIZATION OF THE PROCESS OF IMMOBILIZATION OF LIPASE PRODUCED BY *Marinobacter sp* CH27 IN OCTADECIL – SEPABEAD

ABSTRACT

The aim of these research was the optimize in the support hydrophobic octadecilo-sepabead by interfacial adsorption, for which the experimental design was Box-Behnken 3 factors and 3 levels with a total of 12 experiments and 3 replicas on the central point. The variables and their levels selected were: force Ionic (2.5, 5.0 and 10.0 mM), time (30, 60 and 120 min) and pH (6.0; 7.0 and 8.0) and them variable answers were the activity of the enzyme immobilized (U/g support) and the percentage immobilization. The optimum parameters of the immobilization process were: pH 6.62, 30 min and ionic strength 10 Mm. After adjust the parameters to the model polynomial quadratic, is obtained 11,16 U/g support for the

^a Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Jr. Puno 1002, Lima 1, Perú.

*yfernandezj@unmsm.edu.pe

^b Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad San Ignacio de Loyola.

activity of lipase immobilized, with 81.50% and 74.0% of activity relative and performance of immobilization respectively.

Key words: Lipase, *Marinobacter sp*, immobilization, octadecyl - sepabead, response surface methodology.

INTRODUCCIÓN

Las lipasas presentan diversas propiedades catalíticas que sustentan su empleo en las industrias: alimentaria, farmacéutica, textil, cosmética, papelera, peletera y en detergentes. En los últimos años, las lipasas se usan en la síntesis de biopolímeros y biodiesel, en la producción de medicamentos enantioselectivos y agroquímicos¹. A nivel industrial, los mecanismos catalíticos de las lipasas se asemejan a los procesos metabólicos naturales, siendo biodegradables y limpios. Por las aplicaciones antes descritas, las lipasas producidas por nuevos microorganismos están en constante investigación.

El interés en el desarrollo tecnológico de biocatalizadores se centra en la inmovilización de enzimas, lo cual permite mejorar propiedades térmicas con estabilidad en un rango deseado de pH y en presencia de solventes orgánicos, que sean de fácil recuperación, permitan obtener un producto no contaminado, e incrementar la estabilidad operacional del biocatalizador^{2,3}.

Uno de los protocolos de inmovilización de lipasas es la adsorción selectiva sobre soportes hidrofóbicos, para su uso en solventes acuosos y orgánicos. La adsorción involucra áreas hidrofóbicas alrededor del centro activo, quedando en su forma abierta accesible al sustrato. Así, los soportes hidrofóbicos empleados se comportan como los sustratos naturales de estas enzimas⁴.

El soporte hidrofóbico octadecilo sepabead está conformado de una matriz polimérica de metacrilato cubierto por grupos octadecilos que proporcionan una superficie fuertemente hidrofóbica. Este soporte presenta estabilidad química y térmica, resistencia al cambio osmótico, alta capacidad de unión a proteínas, baja tendencia al hinchamiento en soluciones de elevada molaridad y en solventes⁵.

Marinobacter sp CH 27, bacteria halófila moderada aislada de las Salinas de Pilluana (San Martín), hidroliza diferentes aceites vegetales, contiene una lipasa con estabilidad térmica hasta 45 °C⁶. Por ello, el objetivo de esta investigación fue optimizar las condiciones de inmovilización de esta lipasa, entender la significancia y la interacción de los factores que afectan la actividad específica de la enzima inmovilizada para su uso potencial como biocatalizador.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de la lipasa

Marinobacter sp CH27 fue cultivado en medio agua de sales (SW) conteniendo cloruro de sodio 5%, suplementado con extracto de levadura 0,5%, así como aceite de oliva al 1% y Triton X-100 0,1% como inductor y emulgente, respectivamente. Las condiciones de fermentación y concentración del crudo enzimático fueron las descritas por Fernández-Jeri y col⁶.

Inmovilización de lipasa

Se procedió a una inmovilización por adsorción interfacial usando el soporte octadecilo sepabead (Sepabead EC-OD; Mitsubishi Chemical Corporation, USA) según lo descrito por Guisan⁷ con las siguientes modificaciones: Se pesaron 0,1 g del soporte octadecilo sepabead y se procedió a lavar 5 veces con agua destilada estéril, se hidrató con buffer fosfato al pH y a la concentración salina requerida para cada ensayo a 10 °C durante 24 h. Este soporte ya hidratado fue contactado con 15 mg de proteína contenida en el crudo enzimático y se mezcló suavemente a 10 °C por el tiempo establecido en cada experimento. Después se centrifugó a 5000 rpm a 10 °C por 10 min. Finalmente, se separaron la enzima adsorbida al soporte y el sobrenadante, en este último se determinó proteínas residuales.

Factores que influyen en la inmovilización de la lipasa

Se empleó la Metodología de Superficie Respuesta (MRS) para optimizar las condiciones de máxima actividad específica de la enzima inmovilizada. El diseño estadístico Box-Behnken fue empleado a 3 niveles y 3 factores, para evaluar los parámetros que intervienen en el proceso de inmovilización. El programa Minitab 16 fue empleado obteniendo un total de 12 experimentos y 3 réplicas en el punto central. Las variables y los niveles seleccionados fueron: fuerza iónica (2,5; 5,0 y 10,0 mM de buffer fosfato), tiempo (30, 60 y 120 min) y pH (6,0; 7,0 y 8,0). Para este análisis se emplearon soluciones de buffer fosfato para obtener los pH correspondientes.

En cada ensayo de inmovilización se determinó el porcentaje de inmovilización, la relación de mg de proteína/g de soporte, la actividad específica de la lipasa inmovilizada (U/g soporte) y el rendimiento.

Actividad de la lipasa

En la determinación de la actividad hidrolítica de la lipasa se usó el p-nitrofenil palmitato (p-NPP) (Sigma, USA) siguiendo la metodología propuesta por Gupta y col.⁸, con las siguientes modificaciones: a 1,6 mg de p-NPP se añadieron 1 mL de isopropanol 0,1 mL; Triton X-100 y 25 mM de buffer fosfato a pH 7 hasta completar 10 mL de volumen. Para determinar la actividad enzimática se emplearon 1,75 mL de la solución antes descrita y 0,25 mL del biocatalizador. La mezcla se incubó a 37 °C por 20 min, la hidrólisis del p-NPP se evidenció por el incremento del p-nitrofenol a 410 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de p-nitrofenol en un minuto.

Porcentaje de inmovilización de la lipasa

La cantidad de enzima inmovilizada se determinó midiendo las concentraciones en la solución enzimática inicial (mg proteína inicial), el sobrenadante y en las soluciones de lavado (mg proteína final) usando el reactivo de Bradford, según la metodología del fabricante (AMRESCO). A partir de estos datos se calcularon el porcentaje de inmovilización y los mg de proteína/g de soporte. La albúmina sérica bovina (BSA) se utilizó como estándar a las concentraciones de 125, 250, 500, 750 y 1000 µg/mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inmovilización de la lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27 fue obtenida a diferentes pH, tiempos y diferentes valores de fuerza iónica (tabla 1).

Tabla 1. Factores que influyen en el proceso de inmovilización de la lipasa extracelular de *Marinobacter sp* CH 27, según diseño estadístico experimental Box-Behnken de superficie respuesta.

Experimento (N°)	pH	Tiempo (min)	Fza. Iónica (mM)	Proteína inmovilizada (mg/g)	Inmovilización (%)	Actividad lipasa inmovilizada (U/g soporte)
1	8	60	2,5	8,25	55,00	1,4250
2	6	30	5,0	14,30	95,33	5,5096
3	7	30	2,5	14,39	95,93	10,6601
4	8	30	5,0	10,13	67,50	4,0875
5	6	60	10,0	14,44	96,26	6,8723
6	6	120	5,0	14,61	97,40	4,9117
7	7	120	2,5	14,56	97,07	7,1122
8	8	60	10,0	7,54	50,27	1,0710
9	6	60	2,5	14,59	97,27	2,1207
10	7	30	10,0	14,38	95,87	10,0083
11	8	120	5,0	11,29	75,27	2,1938
12	7	120	10,0	14,63	97,50	3,3638
13	7	60	5,0	14,64	97,60	6,5777
14	7	60	5,0	14,64	97,60	6,5211
15	7	60	5,0	14,42	96,13	5,7581

El mayor porcentaje de inmovilización (97,6 %) se obtuvo en los experimentos 13 y 14 a pH 7,0; 60 min y fuerza iónica 5 mM, y la actividad enzimática máxima después de la inmovilización fue de 10,66 U/g-soporte determinado en el experimento 3 a pH 7,0; 30 min y fuerza iónica de 2,5 mM.

En la figura 1a se observa el efecto de la fuerza iónica sobre la adsorción de las proteínas al soporte. Así, la máxima adsorción se obtuvo a la concentración de 6 mM; en cambio, la actividad máxima de la enzima inmovilizada fue a 2,5 mM (figura 1d).

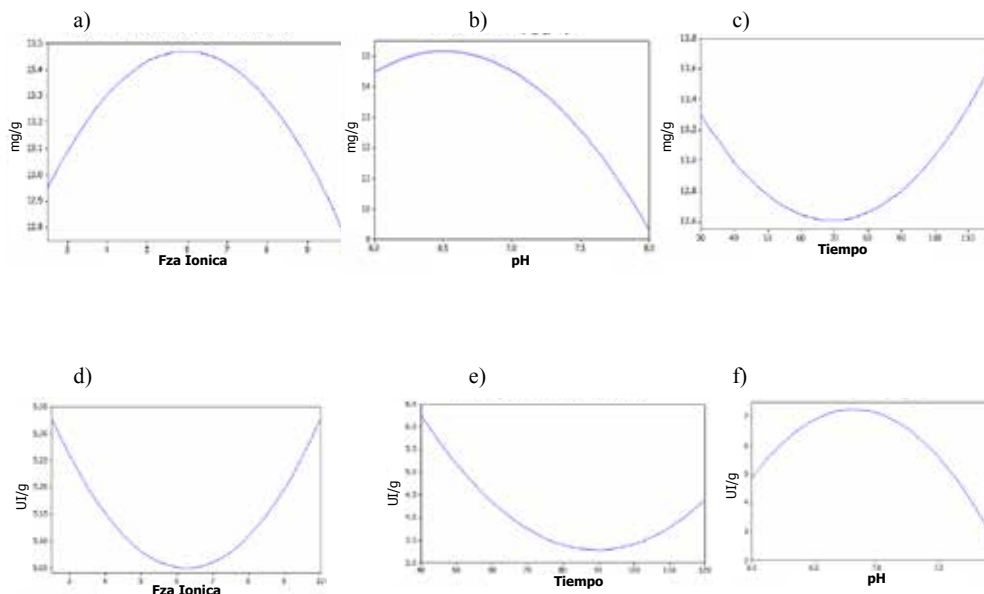


Figura 1. Factores que influyen en la adsorción de la proteína al soporte (a, b y c) y en la actividad específica de la lipasa inmovilizada en octadecilo sepabead durante el proceso de inmovilización (d, e y f)

En las figuras 1c y e se observan el comportamiento de la inmovilización y el tiempo mediante el gráfico de la campana invertida, la adsorción de la enzima al soporte octadecilo sepabead fue antes de los 30 min; pero a medida que el tiempo aumentó la adsorción disminuyó hasta el 84%. Cabe resaltar que a los 70 min de nuevo se incrementó la adsorción de la proteína indicando la presencia de otra lipasa.

El sistema lipasa: octadecilo sepabead fue afectado por el pH, evidenciado en la campana de Gauss generada tanto para la proteína inmovilizada como para la actividad de la lipasa inmovilizada (figuras 1b y f). La máxima actividad de la lipasa inmovilizada fue a pH 7, 0 con 7 U/ g soporte, correspondiendo al 89% de la enzima adsorbida al soporte.

La fuerza iónica es un parámetro importante para el proceso de inmovilización por la interacción hidrofóbica, de este modo la adsorción de las proteínas se incrementa con la fuerza iónica; sin embargo, las diferentes concentraciones de los electrolitos que proveen la fuerza iónica pueden afectar la actividad enzimática^{8,9}. Por lo tanto, este es un parámetro que requiere optimización. Así, a la fuerza iónica mayor de 6 mM disminuyó el rendimiento de inmovilización, este fenómeno puede explicarse por la desorción de la proteína adsorbida por efecto de la alta fuerza iónica, de igual forma Fernández-La Fuente y col.¹⁰; Bastida y col.¹¹; Montero¹², reportaron disminución de la adsorción de la lipasa cuando se incrementa la fuerza iónica. Además, la desorción depende de la enzima, el soporte, el pH y la temperatura.

La rápida adsorción de la enzima al soporte sugiere que la proteína cargada se localizó en la superficie externa del soporte, en lugar de ser distribuida uniformemente a través de los poros del mismo. Tiempos de inmovilización cortos han sido reportados por Montero y col.,¹²; quienes inmovilizaron el 64% de lipasa de *Candida rugosa* en soporte de polipropileno en 1 min.

Las gráficas de contorno muestran la relación entre dos variables independientes a la vez y su efecto en la respuesta de la actividad específica de la lipasa inmovilizada y la proteína inmovilizada en el soporte hidrofóbico octadecilo sepabead (figuras 2 y 3).

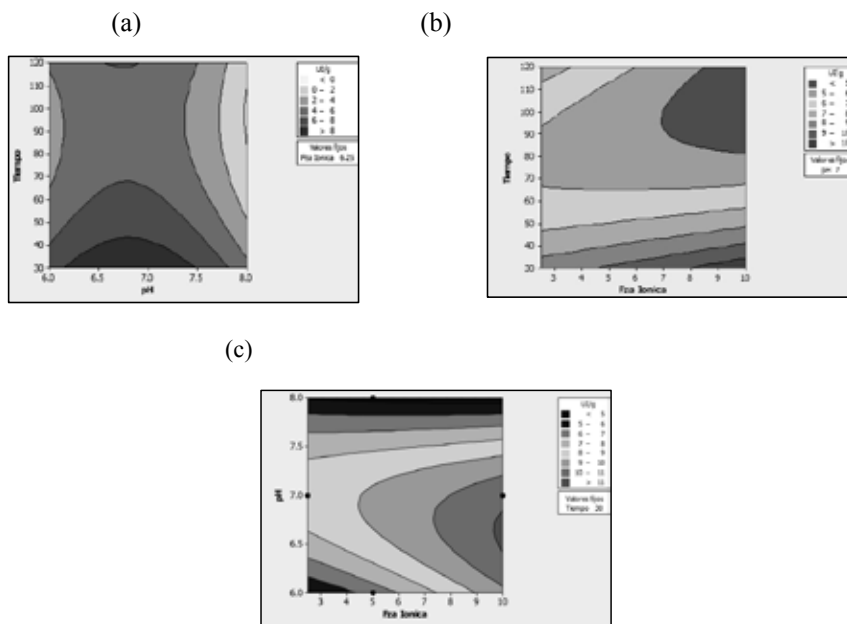


Figura 2. Gráficas de contorno de dos factores, de la actividad específica de la lipasa inmovilizada (U/g) frente a: a) tiempo y pH, b) tiempo y fuerza iónica, c) pH y fuerza iónica.

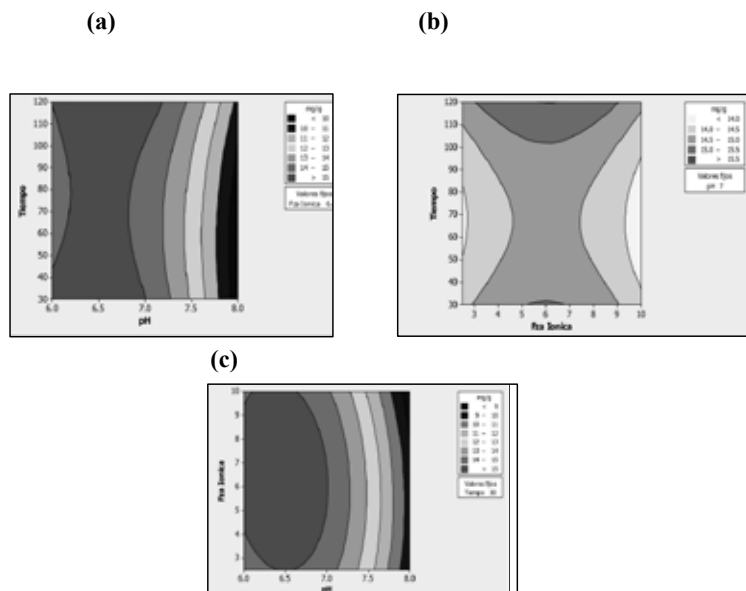


Figura 3. Gráficas de contorno de dos factores, de la proteína inmovilizada (mg/g) frente a: a) tiempo y pH, b) tiempo y fuerza iónica, c) pH y fuerza iónica.

Al variar el tiempo y el pH simultáneamente (figuras 2a y 3a), se evidencia que la máxima actividad específica de la lipasa inmovilizada es mayor que 8 U/g, obtenido en el rango de pH de 6,0 a 7,5 a los 30 min. Por encima de estos valores, la actividad disminuye durante la inmovilización. Estos dos factores son importantes para la actividad de la lipasa durante el proceso de inmovilización. Sin embargo, las mismas variables de tiempo y pH frente a la proteína inmovilizada no presentan la misma respuesta, si bien la mayor concentración de proteína inmovilizada se presentó en el rango de pH entre 6,0 a 7,0; el tiempo de mayor respuesta fue sostenido entre 30 a 120 min. Estos resultados se sustentan por el análisis Anova que indica al pH como la única variable significativa ($P = 0,00$) en la adsorción de la enzima al soporte, además no existe interacción entre las variables pH y tiempo ($P = 0,353$). Con relación al tiempo y fuerza iónica simultáneamente sobre las variables respuestas no se generaron líneas de contorno (figuras 2b y 3b).

En las figuras 2c y 3c, se observa que la máxima actividad específica de la lipasa inmovilizada fue mayor de 11 U/g soporte obtenido a pH mayor que 6,5 y 10 mM de fuerza iónica. En tanto que la máxima respuesta de proteína inmovilizada fue a pH 6,5 entre 4 y 10 mM. Según, el análisis de varianza no existe interacción entre las variables pH y fuerza iónica para ambos casos ($P > 0,05$). Además, la variación de la fuerza iónica en el rango estudiado no influye en el proceso de inmovilización.

La proteína adsorbida a los soportes depende de varios parámetros tales como el tipo de lipasa, la superficie del soporte, las condiciones ambientales y los protocolos de inmovilización. Nuestros resultados evidencian que no existe relación entre la proteína inmovilizada y la actividad específica de la enzima inmovilizada, ya que al incrementar las concentraciones de proteína adsorbida al soporte, la actividad de la enzima disminuye, esto se explica por la interacción proteína-proteína que inactiva el centro activo de la lipasa. Resultados similares ha descrito Yüce13 en la optimización de la inmovilización de la lipasa de *Thermomyces lanuginosuse* con relación a las concentraciones de enzima, buffer y pH frente a la actividad específica.

El diseño estadístico experimental Box-Behnken de superficie respuesta fue empleado para optimizar los parámetros de inmovilización de la lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27. La optimización se realizó para la actividad específica de la lipasa inmovilizada. El ANOVA se presenta en la tabla 2, el modelo se ajusta a un polinomial de segundo orden ($P = 0,020$). Representa la actividad de hidrólisis de pNPP (U/g soporte) como una función del pH (X_1), tiempo (X_2), fuerza iónica (X_3) y es expresado por la siguiente ecuación:

$$Y = 51.2763X_1 - 0.1078171X_2 + 2.88701X_3 - 3.58600 X_1^2 + 0.00107060 X_2^2 + 0.00774500 X_3^2 - 0.00631556X_1X_2 - 0.3521247X_1X_3 - 0.00778456 X_2 X_3$$

Tabla 2. Análisis de varianza de la actividad específica de la lipasa inmovilizada en octadecilo sepeabead.

Fuente	GL	SC Sec.	MC	F	P
Ajust.					
Regresión	9	105,558	11,7287	4,75	0,050**
Lineal	3	27,599	14,4299	5,84	0,043
pH	1	14,147	18,3562	7,43	
tiempo (min)	1	13,444	24,7956	10,03	0,042**
Fza. iónica	1	0,008	0,3698	0,15	
Cuadrática	3	62,790	21,5548	8,72	0,025**
pH*pH	1	49,740	47,3594	19,16	0,715
tiempo *tiempo	1	13,017	13,0431	5,28	
Fza. iónica*Fza. I	1	0,033	0,0329	0,01	0,020**
Interacción	3	15,170	5,0565	2,05	0,007**
pH* tiempo	1	0,195	0,3401	0,14	0,070
pH* Fza. iónica	1	7,305	7,3051	2,96	0,091
tiempo*Fza. iónica	1	7,670	7,6696	3,10	0,226
Error residual	5	12,358	2,471		0,726
					0,146
					0.138

** Estadísticamente significativo

Finalmente, se optimizaron los parámetros y se alcanzó la actividad máxima de 11,16 U/g soporte durante la inmovilización de lipasa en octadecilo sepabead a pH de 6,62; 30 min y fuerza iónica de 10 mM, con una actividad relativa obtenida de 81,50%, y 74,0% de rendimiento de inmovilización de lipasa en octadecilo sepabead.

Las técnicas de adsorción, han demostrado producir biocatalizadores que presentan altas retenciones de actividades catalíticas, aunque este principio es válido sólo para enzimas puras. La inmovilización de extractos heterogéneos, por ejemplo, mezclas de proteínas o extractos crudos, usando métodos de adsorción interfacial en soportes hidrofóbicos, han demostrado ser procesos selectivos de inmovilización de lipasas¹⁰. Además, esta técnica permite en un solo paso inmovilizar, concentrar, purificar e hiperactivar concentraciones pequeñas de lipasas presentes en extractos crudos^{4,10,14,15}. En este aspecto, Palomo y col.¹⁵ emplearon la combinación de dos soportes hidrofóbicos: octil-agarosa y octadecilo sepabead con los que lograron purificar en octil-agarosa e inmovilizar en octadecilo sepabead la lipasa de *Bacillus thermocatenuatus* (BTL2).

El soporte hidrofóbico octadecilo sepabead se parece a la interface formada por los sustratos naturales de la lipasa. La adsorción interfacial puede producir un congelamiento de la estructura de la enzima en su forma abierta y de esta manera incrementar la aparente afinidad de la enzima por el sustrato¹⁴, además de la hiperactivación. Los resultados obtenidos demuestran una adsorción selectiva al soporte hidrofóbico pero no se produce hiperactivación marcada como describen diversos autores^{11,14,15}. En este estudio se usó para-nitrofenil palmitato como sustrato, un ácido carboxílico de cadena larga; por el contrario, Palomo y col.¹⁴ emplearon la adsorción hidrofóbica para inmovilizar las lipasas de *Candida antarctica* (fracción B), *Mucor miehei* y *Candida rugosa* a octadecilo-sepabead y usaron como sustratos para-nitrofenil propionato y etil-butilato, de esta forma demostraron hiperactivación de 2 a 5 veces, para etil-butilato pero no con él para-nitrofenil propionato, probablemente el etil butirato, al ser un compuesto más pequeño, puede acceder fácilmente al centro activo, por lo tanto la hiperactivación depende de la fuente de enzima y del sustrato.

CONCLUSIONES

Se optimizó el proceso de inmovilización de la lipasa producida por *Marinobacter* sp CH27 a las condiciones de pH 6,62; 30 min y fuerza iónica de 10 mM, con una actividad relativa de 81,50%, y rendimiento de inmovilización de lipasa en octadecilo sepabead de 74,0%

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por la subvención N° 031-2011- CONCYTEC - OAJ y contrato N° 017-FINCYT - PIPAB - 2008

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jaeger K-E, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13:390–397
2. Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol UT The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 1999; 29:119–131
3. González-Bacero, J; Rodríguez Hernández, J; Monte Martínez, A. Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Rev Colomb Biotecol* 2010; 12(1): 124-40
4. Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Hugué, J., Guisán, J. M. A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 1998; 58 (5): 486-93
5. Resindion S.R.L. Mitsubishi Chemical Corporation, [homepage on the Internet]. Tokio: Resindion S.R.L.; c2015 [updated 2015 Sep; cited 2016 Nov 16]. Available from: http://www.resindion.com/images/stories/resindion/download/RESINDION_brochure_ReliZyme_SepabeadsEC_set2015_web.pdf
6. Fernández-Jerí, Y; Zavaleta, A.I; Alejandro-Paredes, Luis; Izaguirre, Víctor. Caracterización parcial de una lipasa extracelular de *Marinobacter sp*. Empleando la Metodología de Superficie Respuesta. *Cienc Invest* 2013; 16 (1): 12-17
7. Brena, B.M. y F. Batista-Viera, *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, 2nd Ed. Edited by: J. M. Guisan © Humana Press Inc. Totowa: NJ; 2006.
8. Gupta R, Rath P, Gupta N, Bradoo S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol Appl Biochem* 2003; 37 (1):63–71
9. Oztürk B. Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports. [Doctoral dissertation]. Izmir: Izmir Institute of Technology, Department of Biotechnology and Bioengenergy 2001
10. Fernández-Lafuente R, Armisen P, Sabuquillo P, Fernández-Lorente P, Guisan J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem Phys Lipids* 1998; 93 (1): 185–197
11. Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Hugué, J., Guisán, J. M. A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 1998; 58 (5): 486-93.
12. Montero S, Blanco A, Virto M, Ladenta L C, Agud I, Solozabal R, *et al*. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme., *Enzyme Microb Technol* 1993; 15(3): 239-247
13. Yücel Y. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on olive pomace powder using response surface methodology. *Biocatalysis and Agric Biotechnol* 2012; 1(1) :39–44.
14. Palomo J. M, Muñoz G, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fernández-Lafuente R, and Guisán J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J Mol Catal B Enzyme* 2002; 19: 279–286

15. Palomo J. M, Segura R. L, Fernández-Lorente G. Pernas M, Rúa M. L, Guisán J. M, et al, Immobilization, and Stabilization of a Lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by Interfacial Adsorption on Hydrophobic Supports. *Biotechnol Prog* 2004; 20 (2):630–635

SÍNTESIS DE CATALIZADORES BASADOS EN ÓXIDOS MIXTOS DE Ni-Ti PARA LA PRODUCCIÓN DE ETILENO A PARTIR DE LA DESHIDROGENACIÓN CATALÍTICA DEL ETANO

Daisy Unsihuay^a, Gino Picasso^{a*}, Rosario Sun Kou^b

RESUMEN

Se prepararon catalizadores a base de óxidos de níquel dopados con titanio $Ni_{1-\alpha}Ti_{\alpha}O$ con α de 0,01 a 0,05, por un método de evaporación controlada a 550°C para la deshidrogenación oxidativa (ODH) de etano a etileno. La introducción de pequeñas cantidades de Ti en la celda del NiO tuvo efectos notables sobre las propiedades de óxido simple de níquel, aumentando la superficie BET. Además, se observó una disminución del tamaño del cristal tras el análisis XRD, una generación de nuevos sitios ácidos, evaluados por TPD-NH₃, una redistribución de especies reducibles a temperaturas más bajas y más altas estudiadas a partir del perfil TPR-H₂ y una disminución de los oxígenos no estequiométricos con la composición creciente de titanio detectada por TPD-O₂. Los ensayos catalíticos se llevaron a cabo en condiciones de estado estacionario a una constante W/F de 0,48 g.s / mL con el fin de evaluar la conversión y se modificó la constante W/F de 0,24 a 0,48 g.s / mL, para cuantificar la selectividad al etileno. En todos los catalizadores $Ni_{1-\alpha}Ti_{\alpha}O$, las pruebas catalíticas revelaron un efecto positivo de dopaje de Ti en el rendimiento de las muestras, mejorando los niveles de conversión y de selectividad de etano al etileno, en comparación con el NiO puro. La muestra $Ni_{0,95}Ti_{0,05}O$ logró la mejor selectividad para el etileno (77%) en una conversión moderada de etano del 35%, probablemente debido al aumento de las especies nucleofílicas de oxígeno superficial.

Palabras clave: ODH de etano, conversión de etano, selectividad de etileno.

SYNTHESIS OF CATALYSTS BASED ON Ni-Ti MIXED OXIDES FOR THE PRODUCTION OF ETHYLENE FROM CATALYTIC DEHYDROGENATION OF ETHANE

ABSTRACT

Catalysts based on titanium doped nickel oxides $Ni_{1-\alpha}Ti_{\alpha}O$ with α from 0.01 to 0.05, were prepared by a controlled evaporation method at 550 °C for selective oxidative dehydrogenation (ODH) of ethane to ethylene. The introduction of small amounts of Ti into the NiO lattice

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

^b Departamento de Ciencias-Sección Química, Pontificia Universidad Católica del Perú, Avenida Universitaria 1801 - Lima 32.

had noticeable effects on the nickel simple oxide properties, increasing the BET surface. In addition, it was observed a sustained depletion of crystallite size following XRD analysis, a generation of new acid sites, evaluated by NH₃-TPD, a redistribution of reducible species to lower and higher temperatures studied from H₂-TPR profile and a depression of non-stoichiometric oxygen with the increasing composition of titanium detected by O₂-TPD. The catalytic tests were carried out under steady state conditions at a constant W/F of 0.48 g.s/mL in order to evaluate the conversion and modifying W/F from 0.24 to 0.48 g.s/mL, to quantify the selectivity to ethylene. In all the Ni_{1- α} Ti α O catalysts, the catalytic tests revealed a positive doping effect of Ti in the performance of the samples, improving the ethane conversion and selectivity levels to ethylene, in comparison to the pure NiO. The sample Ni_{0.95}Ti_{0.05}O achieved the best selectivity to ethylene (77%) at a moderated ethane conversion of 35%, probably due to the increasing of the nucleophilic species of surface oxygen.

Key words: ODH, ethane, Ti-doped NiO, ethylene selectivity.

INTRODUCCIÓN

El etileno es la materia prima orgánica de mayor consumo en la industria química y se espera que su demanda siga en aumento en los próximos años. En este contexto, es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías para la producción de etileno con el fin de satisfacer las demandas esperadas de los próximos años¹. La deshidrogenación oxidativa (ODH) de etano es una ruta alternativa atractiva ya que opera a bajas temperaturas (~400 °C), es económica y amigable con el medio ambiente en comparación con el craqueo al vapor, un proceso altamente endotérmico que opera por encima de 800 °C y hoy en día el principal método de obtención de etileno². Sin embargo, el logro de altos niveles de conversión de etano y una alta selectividad a etileno son particularmente difíciles debido a que las olefinas tienden a oxidarse a CO₂ y CO. Este último, es la principal causa de envenenamiento del catalizador y disminuye drásticamente su rendimiento³. Por lo tanto, el desarrollo de un catalizador activo y selectivo para la conversión de etano a etileno a bajas temperaturas es clave para que la ODH de etano sea competitiva con el craqueo a vapor. A lo largo de los últimos años, un gran número de catalizadores basados en metales de transición se han preparado de los cuales los catalizadores basados en níquel han reportado alcanzar buenos niveles de conversión de etano, sin embargo, la selectividad es todavía una tarea difícil de mejorar. La incorporación de promotores en la red de NiO tales como Ta, Nb, Ce, Co, W y Al aumentó el rendimiento de los catalizadores basados en NiO⁴⁻⁹. Heracleous y col.⁶, reportaron que la adición de promotores con valencia mayor que Ni²⁺ tuvo un efecto positivo en el logro de buenas selectividades ya que eran capaces de disminuir los defectos catiónicos, y por lo tanto, las especies de oxígeno no selectivos que conllevan a la sobreoxidación de la olefina. En el conjunto de catalizadores ensayados, el único catalizador a base de Ni-Ti exhibió buenos niveles de selectividad (85%) pero, por el contrario, la conversión de etano (10%) era muy pobre. En el presente trabajo, en base a los prometedoros resultados reportados en la literatura sobre catalizadores de Ni-Ti-O, hemos explorado el papel de catalizadores de dopaje NiO con diferentes cantidades de Ti con el fin de mejorar los niveles de actividad y selectividad. Un método de evaporación

simple pero controlada se realizó con el fin de favorecer la integración de fases para formar una solución mixta.

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis de los catalizadores

Solución de isopropóxido (trietanolaminato) de titanio (IV) ($C_9H_{19}NO_4Ti$) (80 wt.% en isopropanol) se adquirió de Aldrich y nitrato de níquel hexahidratado ($Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) níquel (II) se adquirió de Merck (99% de pureza), ambos reactivos fueron usados como precursores de los óxidos mixtos sin purificación adicional. Etanol (Merck, pureza 99,9%) fue empleado como un disolvente.

Una serie de catalizadores con diferente composición atómica $Ni_{1-\alpha}Ti_\alpha O$ con ($\alpha = 0, 0,01, 0,03, 0,04, 0,05$ y 1) se prepararon mediante el método de evaporación. Debido a que TiO_2 puede formarse directamente a partir de la hidrólisis del alcóxido de titanio en un medio acuoso, el etanol se empleó como solvente para las soluciones precursoras para moderar la alta reactividad y $C_9H_{19}NO_4Ti$ se utilizó como precursor de Ti a fin de proporcionar más estabilidad al sistema y evitar la segregación de fases durante la síntesis. Las soluciones etanólicas de $C_9H_{19}NO_4Ti$ y $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ se prepararon por separado y se utilizaron inmediatamente para la síntesis. La solución de Ti se añadió gota a gota a la solución de Ni con agitación vigorosa a temperatura ambiente y se mantuvo en las mismas condiciones durante 30 minutos. Después, la evaporación del etanol se llevó a cabo a 80 °C hasta que se obtuvo un gel verde. Luego, el gel se dejó secar a 120 °C durante 12 horas, seguido de calcinación con aire a 550 °C a una velocidad de calentamiento de 2 °C/min durante 4 horas.

Caracterización de los catalizadores

Las propiedades texturales de los sólidos fueron estudiadas utilizando el equipo Micromeritics GEMINI VII a la temperatura de nitrógeno líquido. Las muestras se trataron previamente en el vacío por la desgasificación a 250 °C durante 2 h. El área superficial se calculó de acuerdo con el método BET. La distribución de tamaño de poro y tamaño del poro medio se estimaron por el método de análisis BJH aplicado a la rama de desorción de la isoterma. El análisis elemental por espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDX) se llevó a cabo para determinar las composiciones de los catalizadores.

La estructura cristalina de las muestras fue evaluada por difracción de rayos X (XRD). El análisis se realizó con un difractómetro Siemens D5000 Krystalloflex, que opera con los siguientes parámetros: la radiación $Cu K\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), 15 mA, 30 kV, filtro de Ni, ángulo 2θ en un rango de 10 a 90° con una velocidad de 0,04°/s. El tamaño de cristal se estimó usando la ecuación de Scherrer de la señal más intensa difracción de rayos X.

La capacidad reductora de las muestras fue analizada por reducción a temperatura programada (TPR) en el equipo Micromeritics ChemiSorb 2750. Los experimentos se realizaron en un reactor con 50 mg de catalizadores bajo atmósfera de hidrógeno diluido (5% de H_2 en He) de 30 a 850°C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

La acidez de las muestras se midió a través de una desorción a temperatura programada de NH_3 . Las muestras se cargaron en un tubo de cuarzo en forma de U (50 mg). El tratamiento previo de la muestra se llevó a cabo de la siguiente manera: una purga con helio se hizo durante una hora a 100 °C. Después, el gas se cambió a amoníaco para dar paso a la adsorción durante 30 minutos a la misma temperatura y finalmente se hizo otra purga con helio durante una hora para eliminar las moléculas de amoníaco que no fueron adsorbidas por la muestra. Después se procedió a calentar el horno con una rampa de 15 °C/min desde 100 °C a 600 °C bajo un flujo de helio y se mantuvo a la temperatura final durante media hora hasta que la señal regresó a la línea de base. La cantidad desorbida de NH_3 se monitorizó mediante un detector de conductividad térmica (TCD), utilizando el software V1.03 TPX ChemiSoft.

Ensayos catalíticos

Los estudios de reactividad de los catalizadores se realizaron en un reactor de lecho fijo de cuarzo. Una pequeña cantidad de lana de cuarzo se colocó en la frita de vidrio para obstaculizar el flujo del catalizador a través del tubo de cuarzo. Para cada catalizador, 200 mg de muestra se mezclaron con 400 mg de cuarzo con el fin de favorecer una distribución homogénea de la temperatura. Un separador de agua se instaló al lado del horno para capturar el agua que puede ser producida como un subproducto de la ODH etano. La composición del flujo de alimentación de la reacción fue de 0,25% C_2H_6 , 0,25% de O_2 y N_2 como gas de equilibrio. Los experimentos conversión de etano se realizaron en el intervalo de temperatura de 300-450°C, en una proporción constante W/F de 0,48 gs/mL. La selectividad de etileno frente a la conversión de etano se midió a una temperatura fija de 450 °C y W/F varió de 0,24 a 2,4 gs/mL. Para todas las muestras, la conversión de etano, y los niveles de selectividad de etileno se calcularon basándose en el balance de carbono con un error experimental inferior al 5% para todas las medidas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Caracterización por sorción de N_2 y XRD

La relación metálica de los Ni-Ti-O se determinó por EDX. Las composiciones estequiométricas teóricos para los catalizadores fueron aproximados con los resultados experimentales (tabla 1). Las isotermas de adsorción-desorción de N_2 están mostradas en la figura 1. Los catalizadores de NiO y Ni-Ti-O exhibieron la típica isoterma de tipo IV correspondiente a sólidos micro-mesoporosos donde se produce adsorción en multicapas. Se puede apreciar que las isotermas poseen histéresis de tipo H_3 originada por condensación capilar que solo se da cuando se presentan mesoporos (poros de 2 a 50 nm). Este tipo de histéresis es característica de materiales compuestos por partículas de poros flexibles con morfología de tipo rendija. Por otro lado el TiO_2 mostró una isoterma de tipo IV con histéresis del tipo H_2 causado cuando la distribución de tamaño y la forma de los poros no están bien definidos y también indicativo de constricciones de cuello de botella. Las áreas BET (tabla 1) registradas para los catalizadores de NiO fueron relativamente pequeñas en el rango de 8-46 m^2g^{-1} pero acorde a lo esperado por el método de evaporación usado para la preparación de los catalizadores ya que no tiende a producir áreas superficiales grandes en comparación

a otros métodos como sol-gel, precipitación, etc. Se observó un aumento notorio del área superficial del NiO a mayor contenido de Ti. Este aumento posiblemente ocasionado gracias a la naturaleza orgánica del precursor de Ti, cuya descomposición durante la calcinación produjo una estructura más porosa por ende un incremento en el área superficial⁶.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de los catalizadores Ni-Ti-O.

Muestra	Composición metálica (mol%)	Área BET (m^2g^{-1})		Tamaño de poro (nm)	Tamaño de cristal (nm)	Parámetro de red (Å°)
		Antes de la reacción	Después de la reacción			
NiO	Ni(99.9)	7	4	10,4	30,655	4,177
Ni _{0.99} Ti _{0.01} O	Ni(99.2):Ti(0.8)	10	10	9,5	29,159	4,177
Ni _{0.97} Ti _{0.03} O	Ni(97.4):Ti(2.6)	17	14	11,4	25,859	4,177
Ni _{0.96} Ti _{0.04} O	Ni(96.2):Ti(3.8)	23	23	9,5	25,723	4,181
Ni _{0.95} Ti _{0.05} O	Ni(94.7):Ti(5.3)	46	39	8,3	23,580	4,181
TiO ₂	Ti(99.9)	54	-	5,9	-	-

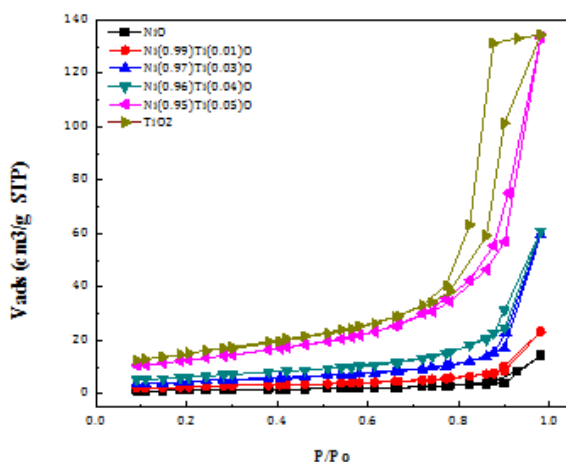


Figura 1. Isotermas de sorción de N_2 de los catalizadores Ni-Ti-O.

Los patrones XRD de los catalizadores de Ni-Ti se representan en la figura 2. Se presentaron picos atribuidos a NiO con estructura de bunsenita que es la fase predominante en todos los catalizadores Ni-Ti con los picos principales: $37,1^\circ$, $43,3^\circ$, $62,8^\circ$, $75,5^\circ$ y $79,3^\circ$ atribuidos a (111), (200), (220), (311) y (222) planos, respectivamente, de acuerdo con JCPDS 47-1049. Se encontraron también pequeños picos a $35,6^\circ$ y $54,0^\circ$ correspondientes a la fase rutilo TiO_2 (JCPDS 21-1276) y picos a $33,3^\circ$ y $49,6^\circ$ correspondientes a NiTiO_3 (JCPDS 33-0960) en los catalizadores con $\alpha = 0,03$, $0,04$ y $0,05$. El TiO_2 exhibió fuertes picos de difracción situados a $24,8^\circ$, $37,3^\circ$, $47,6^\circ$, $53,5^\circ$, $55,1^\circ$ y $62,2^\circ$ correspondientes a la anatasa (JCPDS 21-1272), que es la fase principal formada a través de la calcinación directa del precursor de titanio a 550°C . Los picos de rutilo también se pueden ver a través de los pequeños picos

alrededor de $27,4^\circ$ y $41,4^\circ$ que corresponden a los planos (110) y (111), respectivamente (JCPDS 21-1276). El tamaño de partícula se calculó a partir del pico de difracción mayor (200) usando la fórmula de Scherrer y los resultados se dan en la tabla 1. Se evidenció una correlación inversa entre el área superficial y el tamaño de partícula de los catalizadores como se esperaba. También se puede observar un ensanchamiento en los picos de difracción a mayor contenido de Ti, lo que sugiere que Ti tiende a afectar a la cristalinidad de los catalizadores basados en Ni, y como consecuencia, se espera que las partículas más pequeñas se formen dando áreas superficiales más altas. También se observó una pequeña disminución del parámetro de red, probablemente debido a un dopaje parcial de las especies de Ti^{4+} en la estructura de NiO.

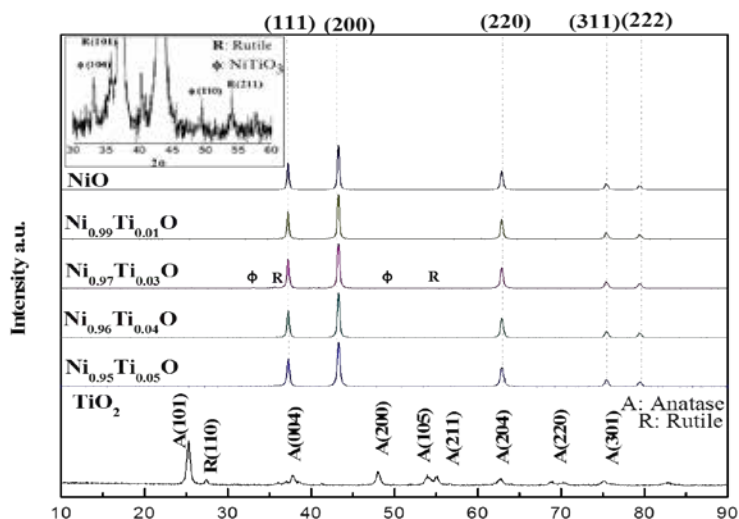


Figura 2. Difractograma de los catalizadores Ni-Ti-O.

2.- Reducción a Temperatura programada (TPR- H_2)

En la figura 3 se muestra el perfil TPR de los catalizadores de níquel dopados con titanio. El NiO puro muestra un pico de reducción a $421^\circ C$, lo que sugiere la presencia de una sola especie de Ni. El Ni^{2+} es reducido en una sola etapa a níquel metálico de acuerdo a la siguiente ecuación: $NiO + H_2 \rightarrow Ni + H_2O$. El test realizado a TiO_2 bajo las mismas condiciones del análisis TPR mostró que este compuesto no es reducible en el rango de temperatura trabajado. Sin embargo, la adición de pequeñas cantidades de Ti a la estructura del Ni alteró seriamente el perfil TPR- H_2 de los catalizadores. Los óxidos de NiO dopados con Ti mostraron curvas TPR más anchas que se van separando a mayor contenido de Ti y partir $Ni_{0.97}Ti_{0.03}O$ se evidenció la presencia de tres picos de reducción, lo que sugiere la contribución de tres especies reducibles de Ni en varias formas. Asimismo, los picos se desplazaron a temperaturas más altas, lo que muestra que el Ti tiende a inhibir el proceso de reducción del Ni^{2+} . El hombro ubicado a temperaturas más bajas entre $260-380^\circ C$ es atribuido en la literatura a la reducción de trazas de Ni^{3+} en el compuesto Ni_2O_3 ¹⁰. El pico principal central es atribuido a la reducción

del $\text{Ni}^{2+} \rightarrow \text{Ni}^0$, mientras que el pico a temperaturas más altas entre 500 a 530°C se podría deber a la fuerte interacción de los Ni^{2+} con Ti^{4+} , dado que la inserción de estas especies en la celda del Ni^0 balancearían las cargas del sistema, haciéndolo más estable y por ende más difícil de reducir. El consumo de hidrógeno disminuyó en proporción al mayor contenido de Ti, lo que es lógico pues hay menos especies de Ni^{2+} reducibles, a excepción de la muestra con $\text{Ni}_{0,99}\text{Ti}_{0,01}\text{O}$ que no sigue la tendencia y exhibe una drástica disminución del consumo de hidrógeno (tabla 2).

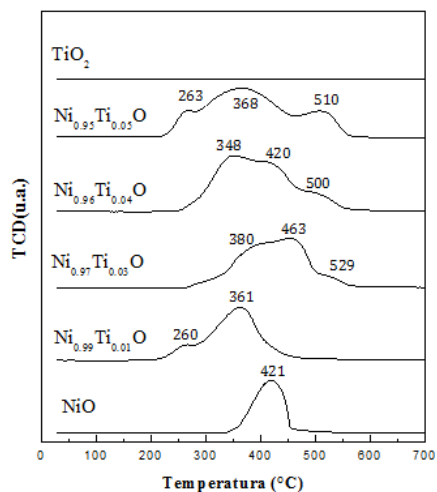


Figura 3. Perfil TPR de los catalizadores Ni-Ti-O.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de los catalizadores Ni-Ti-O.

Muestra	Consumo de H_2 (mmol/g)		Desorción de NH_3 (mmol/g)		
	Teórico	Experimental	MT	AT	Acidez Total
NiO	13,39	13,28	38,33	17,36	55,69
$\text{Ni}_{0,99}\text{Ti}_{0,01}\text{O}$	13,38	10,57	29,86	21,79	51,65
$\text{Ni}_{0,97}\text{Ti}_{0,03}\text{O}$	13,36	13,27	64,34	32,23	96,57
$\text{Ni}_{0,96}\text{Ti}_{0,04}\text{O}$	13,35	12,98	50,41	36,58	86,99
$\text{Ni}_{0,95}\text{Ti}_{0,05}\text{O}$	13,34	11,69	41,34	42,92	84,26
TiO_2	-	-	26,66	20,32	47,01

3.- Análisis Termogravimétrico (TGA)

Como se observa en la figura 4, la pérdida de peso para los precursores de NiO y $\text{Ni}_{0,95}\text{Ti}_{0,05}\text{O}$ ocurrió en el mismo número de etapas. Para la formación de NiO a partir de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se identificaron cuatro etapas principales y la pérdida de peso en cada etapa corresponde a los productos liberados por las reacciones de descomposición térmica de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ propuestas por Brockner¹¹. La primera etapa (9,82% en peso) que se produce en el intervalo de temperatura de 60°-100°C corresponde a la exclusión de un equivalente de agua y algunas

trazas de disolvente. La segunda pérdida de peso (18,15% en peso) entre 100°-224°C se asignó a la eliminación de tres equivalentes de H₂O. La tercera etapa en el intervalo de 224°-332 °C con una pérdida de peso de 38,33% se asignó a la eliminación de NO₂, HNO₃ y H₂O a través de la descomposición de Ni(NO₃)₂·2H₂O. La cuarta etapa (2,67% en peso) se puede atribuir a la descomposición de óxido de Ni₂O₃ a NiO. Para la síntesis de Ni_{0,95}Ti_{0,05}O se observó el mismo número de pasos. La primera pérdida de masa (7,04% en peso) se debe a la eliminación del agua del precursor de Ni y a la hidrólisis del precursor de Ti. La segunda etapa mostró una mayor pérdida de masa (33,73%) en comparación con la curva Ni(NO₃)₂·6H₂O que podría estar asociada a la liberación de CH₃OH a partir de la hidrólisis de Ti[N(CH₂CH₂O)₃(CH₃O)]²⁰ y la exclusión de agua y NO₂ de la descomposición parcial de Ni(NO₃)₂·2H₂O. La tercera pérdida de masa (29,54%) corresponde a la descomposición total de la fase Ni(NO₃)(OH)_{1,5}O_{0,25}·H₂O a Ni₂O₃¹⁹ y la eliminación del ligando orgánico del precursor de Ti. La última etapa (2,22%) en el intervalo de 310° a 450 °C podría atribuirse a la descomposición de óxido de Ni₂O₃ a fase NiO considerando que el óxido de Ti se descompuso en la etapa anterior. Por otra parte, la gráfica termogravimétrica mostró una curva casi plana más allá de 450°C para ambos catalizadores, lo que indica que la temperatura de calcinación utilizada fue apropiada para la síntesis del catalizador (550°C) para asegurar la calcinación total de la fase orgánica y la formación de la fase cristalina.

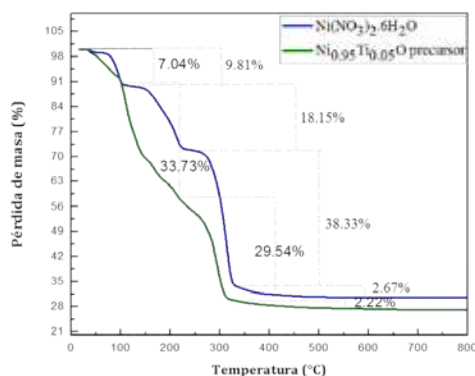


Figura 4. Termograma de los precursores de NiO y Ni_{0,95}Ti_{0,05}O.

4.- Espectroscopía Raman

Los espectros Raman de los catalizadores de níquel dopados con Ti se representan en la figura 5. El óxido de níquel exhibió un pico principal a aproximadamente 504 cm⁻¹ atribuido al modo de fonón óptico (TO) de primer orden y se origina a partir de los defectos en el cristal de NiO y otro menos intenso a 720 cm⁻¹ atribuido al fonón longitudinal óptico. Los picos a 198 cm⁻¹ (E_g), 396 cm⁻¹ (B_{1g}), 515 cm⁻¹ (A_{1g}) y 638 cm⁻¹ (E_g) se asignaron a la fase anatasa con el grupo espacial D_{4h} para el TiO₂. No se encontraron picos de fase rutilo probablemente debido a que los picos más intensos de la anatasa ocultaron los picos rutilo. La presencia de pequeñas cantidades de Ti cambió dramáticamente los espectros de NiO. Los picos a 319,

446 y 587 cm^{-1} correspondientes a la fase rutilo de TiO_2 aparecieron en los espectros, mientras que los picos de NiO a 504 cm^{-1} y 721 cm^{-1} cambiaron a 511 cm^{-1} y 750 cm^{-1} , respectivamente, lo que sugiere la fuerte interacción entre Ti y NiO. Estos resultados están de acuerdo con los resultados XRD y TPR.

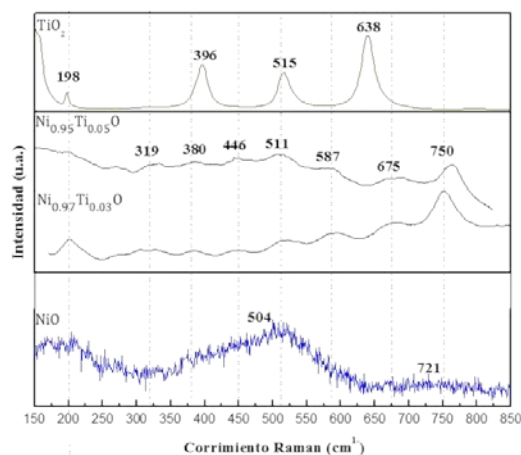


Figura 5. Espectros Raman de los catalizadores Ni-Ti-O.

5.- Desorción a Temperatura Programada de NH_3 (TPD- NH_3)

La cooperación de sitios ácidos con sitios básicos es sumamente importante en reacciones particular e influye mucho en la selectividad de las reacciones, por tanto es necesario saber cómo las fuerzas de los sitios ácidos están distribuidas. Para caracterizar la naturaleza de los sitios ácidos se usó la desorción a temperatura programada de NH_3 . Los picos de desorción en rangos de temperatura máxima de 180 a 250 $^{\circ}\text{C}$ (BT), 280-330 $^{\circ}\text{C}$ (MT) y 380-500 $^{\circ}\text{C}$ (AT) normalmente se atribuyen a NH_3 quimisorbido en sitios ácidos débiles, medianos y fuertes, respectivamente. Las muestras presentan un perfil con dos picos de desorción (figura 6). El pico de menor temperatura correspondiente a la acidez intermedia ubicada entre 320-330 $^{\circ}\text{C}$ y el pico de mayor temperatura de acidez fuerte ubicado en el rango entre 450-490 $^{\circ}\text{C}$, aproximadamente. Se observó que la adición de pequeñas cantidades de Ti provocó el aumento de sitios ácidos en comparación al NiO puro. Asimismo, se observó un aumento progresivo de la acidez fuerte a mayor contenido de Ti^{4+} .

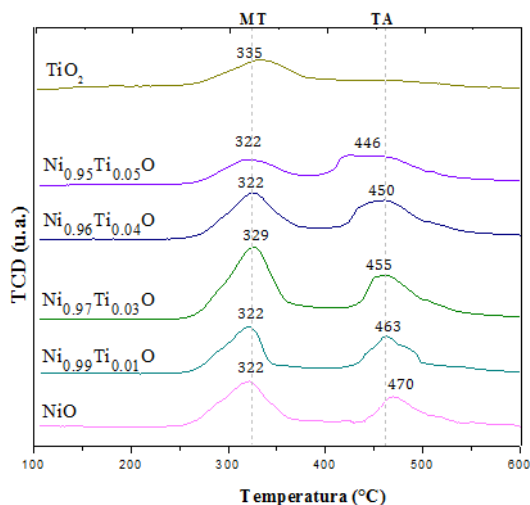


Figura 6. Perfil TPD-NH₃ de los catalizadores Ni-Ti-O.

6.- Desorción a Temperatura Programada de O₂ (TPD-O₂)

Las mediciones de TPD-O₂ con adsorción previa de O₂ (figura 7) se realizaron para evaluar el tipo de oxígeno superficial y sus propiedades que podrían dar algunas luces para entender el proceso de oxidación catalítica. Se registró la liberación de oxígeno del catalizador de 25°C a 850°C. El perfil de desorción de oxígeno para los catalizadores Ni-Ti-O, exhibió tres picos correspondientes a tres especies de oxígeno. Según Iwamoto et al.¹², el oxígeno molecular se adsorbe sobre la superficie de óxidos metálicos formando superóxidos e iones peróxido. Los cuatro estados diferentes de oxígeno adsorbidos a intervalos de temperaturas crecientes son: α (30-40 °C), β (320- 360 °C), γ (420-450 °C) y δ (por encima de 520 °C) correspondientes a O₂, O₂⁻, O⁻ (para γ y δ), respectivamente¹². Por lo tanto, según la literatura los tres picos compilados por los catalizadores corresponden a las especies β , γ y δ . El NiO exhibió un gran pico de desorción de oxígeno a una temperatura máxima de 700 °C, correspondiente a un estado de oxígeno no estequiométrico O⁻. Cuando O⁻ y O₂⁻ están presentes en la superficie del catalizador, facilitan la oxidación total del hidrocarburo debido a la naturaleza electrofílica de estos iones de oxígeno que atacan directamente a la molécula orgánica en la región de su más alta densidad electrónica (enlaces Π). Por otro lado, es probable que especies como O₂⁻ conduzcan a la producción de productos oxigenados a través de un ataque nucleofílico. Debido a sus propiedades no oxidantes, la presencia de iones O₂⁻ promueve una reacción más selectiva¹³.

La cantidad de oxígeno desorbido mostrada en la tabla 2 indica una caída apreciable de la liberación de oxígeno con un mayor contenido de Ti, comenzando con 244,89 mmol/g de O₂ para NiO hasta 108,52 mmol/g de O₂ para Ni_{0.95}Ti_{0.05}O. Además, el pico asignado a especies δ disminuyó en intensidad y se desplazó a temperaturas más bajas hasta una señal débil, que se registró para la muestra Ni_{0.95}Ti_{0.05}O. Este resultado muestra que las especies de Ti disminuyen

notablemente la presencia de oxígeno no estequiométrico causado por las vacantes catiónicas en NiO. De acuerdo con Heracleous *et al.*⁶, la inserción de iones con mayor valencia que Ni²⁺ como Ti⁴⁺ disuelven los huecos positivos p⁺ a través del llenado de las vacantes catiónicas de NiO. Por lo tanto, se obtiene una superficie con menos defectos que absorbe menos cantidad de oxígeno¹⁴. Como las especies electrofílicas O₂- y O- se encuentran en menor cantidad, hay menor capacidad de causar una oxidación profunda de la olefina, por lo que se espera que alcancen mayores niveles de selectividad.

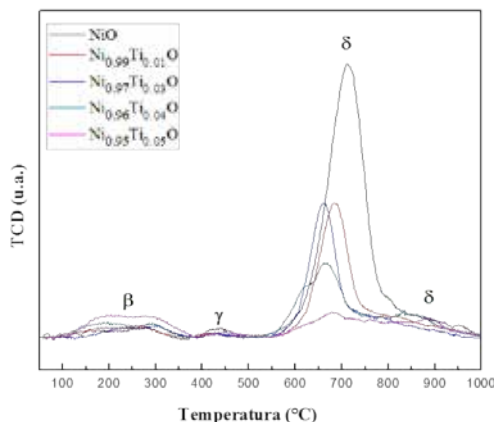


Figura 7. Perfil TPD-O2 de los catalizadores Ni-Ti-O.

Ensayos catalíticos

Los ensayos catalíticos se realizaron dentro de un intervalo de temperatura de 300-450 °C con una constante de W/F=0,48 g.s/mL y los resultados se muestran en la figura 8. Los resultados de conversión de etano con el aumento de temperatura mostraron que la adición de Ti en la estructura del NiO tuvo un efecto positivo en términos de actividad. A pesar que áreas superficiales relativamente bajas se obtuvieron en general, se alcanzaron altos niveles de conversión de etano que aumentó con una mayor composición de Ti en la muestra. Estos resultados podrían estar asociados al incremento en el área superficial reportado anteriormente, así como la presencia de sitios ácidos nuevos causados por el desequilibrio de la carga en los enlaces Ni-Ti-O que favorece la adsorción de la parafina. La capacidad reductora de los catalizadores también tuvo un papel importante: la reducibilidad del NiO se vio afectada con la adición de Ti causando una distribución de las especies de Ni que se desplazaron a temperaturas bajas y altas. Las especies desplazadas a temperaturas más bajas podrían ser responsables a la mejor reducción de la superficie del catalizador. Los experimentos de selectividad se realizaron a temperatura constante de 400 °C variando W/F de 0,24 a 2,4 g.s/mL (figura 5). Los resultados indicaron que el Ti también tuvo un efecto positivo en la selectividad de los catalizadores. La selectividad mejoró de 35% de NiO a aproximadamente 77% para Ni_{0.95}Ti_{0.05}O, todos los catalizadores experimentaron una declinación en los niveles de selectividad de menos de 15% dentro de la gama de conversión. Es importante destacar que los catalizadores fueron capaces de lograr buenos niveles de

selectividad a los niveles de conversión moderados. El aumento de los niveles de selectividad podría atribuirse a la reducción dramática del oxígeno no estequiométrico en la red del NiO ya que la presencia de especies electrofilicas de oxígeno (O^- y O_2^-) en la superficie de la NiO son las responsables de la oxidación total de etano. El dopante promotor Ti^{4+} , debido a su valencia más elevada, podría ser beneficioso para reducir los efectos positivos creados en el óxido no estequiométrico de NiO. Este fenómeno ha sido abordado antes por varios grupos^{6, 15}. La mejora de selectividad también es pertinente a los resultados de TPR que revelaron la presencia de alta temperatura especies de Ni reducibles que la disminución de la labilidad del oxígeno en la superficie, pero de una manera controlada, porque una gran cantidad de enlaces fuertes Ni-O en la superficie tendría un efecto negativo en la actividad de los catalizadores que no se exhiben en los experimentos. La medida de las áreas BET de los catalizadores de Ni-Ti-O, después de la reacción, no mostraron una reducción significativa de la superficie, lo que sugiere que no se dio la formación de coque (o en todo caso, fue insignificante) durante la reacción, sin embargo, se requieren estudios de estabilidad térmica (tabla 1).

De los resultados obtenidos en los experimentos, se pudo observar que el Ti tuvo un efecto promotor en la primera etapa del mecanismo, es decir Mars-Van Krevelen, pues tiene la propiedad de debilitar suficientemente el enlace Ni-O para facilitar la reducción de la superficie, pero al mismo tiempo hace el enlace Ni-O lo suficientemente fuerte para evitar la profunda oxidación del etileno. La temperatura de calcinación también afectó al rendimiento de los catalizadores; en lugar de ceder catalizadores con áreas de superficie alta que produjo catalizadores con sitios ácidos fuertes que mejoró la conversión de etano, pero el área pequeña podría haber limitado el acceso de la olefina para promover las reacciones secundarias.

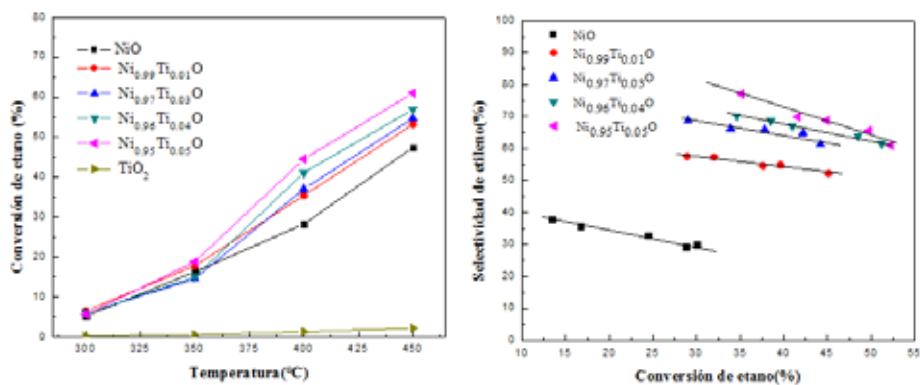


Figura 8. Ensayos catalíticos de los catalizadores: a) conversión de etano vs. Temperatura con W/F=0,48 gs/mL y b) selectividad de etileno Vs. Conversión de etano a 400 °C.

CONCLUSIONES

Los catalizadores sintetizados a base de NiO dopados con Ti mostraron un efecto muy positivo en la mejora del rendimiento de los catalizadores para conseguir buenos niveles tanto de actividad como de selectividad. El Ti y Ni resultaron trabajar sinérgicamente para promover la generación de sitios ácidos y una redistribución de especies reducibles a bajas y altas temperaturas que conducen a la conversión de etano y un agotamiento de los oxígenos no estequiométricos, obteniendo un catalizador más selectivo hacia el etileno. La actividad de los catalizadores parece no verse afectada por las superficies bajas obtenidas y más bien basarse en la acidez conseguida. Este hecho resalta el efecto de la temperatura de calcinación y el método de síntesis utilizado para la fabricación de los catalizadores Ni-Ti.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el apoyo financiero para este trabajo proporcionado por el Programa INNOVATE PERÚ (Convenio N° 229-FINCyT-2013), a la Universidad Nacional de Ingeniería - Facultad de Ciencias y al Instituto General de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería (IGI), por el apoyo financiero para nuestro grupo de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GlobalData [Internet]. 2016 [citado el 02 Jun 2016]. Disponible en: <http://store.globaldata.com/market-reports/Oil--Gas>
2. Gartner C, Van Vee A, Lercher J. Oxidative Dehydrogenation of Ethane: Common Principles and Mechanistic Aspects. *ChemCatChem*. 2013;5(11):3197-3198.
3. Cavani F, Trifiró F. The oxidative dehydrogenation of ethane and propane as an alternative way for the production of light olefins. *Catal Today*. 1995;24:307-313.
4. Boukhlof H, Barama A, Benrabaa R, Guerrero Caballero J, Löfberg A, Bordes-Richard E. Catalytic activity in the oxidative dehydrogenation of ethane over Ni and/or Co molybdate catalysts: Synthesis and characterization, *Comptes Rendus Chimie*. 2017;20(1): 30-39.
5. Zhu D, Rosenfeld D, Anjum S, Sangaru Y, Saih S, Ould-Chilk S, et al. Ni-Ta-O mixed oxide catalysts for the low temperature oxidative dehydrogenation of ethane to ethylene. *J Catal*. 2015;329:291-306.
6. Heracleous E, Lemonidou A. Ni-Nb-O mixed oxides as highly active and selective catalysts for ethane production via ethane oxidative dehydrogenation. Part I: Characterization and Catalytic performance. *J Catal*. 2006;231:162-174.
7. Brussino P, Bortolozzi JP, Milt VG, Banús ED, Ulla MA. Ni/Ce/ γ -Al₂O₃ coated onto cordierite monoliths applied to Oxidative Dehydrogenation of Ethane (ODE). *Catal Today*. 2016;273:259-265.

8. Skoufa Z, Xantri G, Heracleous E, Lemonidou AA. A study of Ni-Al-O mixed oxides as catalysts for the oxidative conversion of ethane to ethylene. *Appl Catal A*. 2014;471:107-117.
9. Heracleous E, Lemonidou AA. Ni-Me-O mixed metal oxides for the effective oxidative dehydrogenation of ethane to ethylene-Effect of promoting metal Me. *J Catal*. 2010;270:67-75.
10. Kotsev N, Ileva L. Determination of non-stoichiometric oxygen in NiO by temperature-programmed reduction. *Catal Letters*. 1993;18:173-176.
11. Brockner W, Ehrhaurdt C, Gjikaj M. Thermal decomposition of nickel nitrate hexahydrate, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, in comparison to $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. *Thermochim Acta*. 2007;456: 64-68.
12. Iwamoto M, Yoda Y, Egashira M, Seiyama T. Study of Metal Oxide Catalysis by Temperature Programmed Desorption. Chemisorption of Oxygen on Nickel Oxide. *J Phys Chem*. 1976;80(18): 1989.
13. Guang-Rui G, Ying-Ai L, Yan-Chun T, Zhi H, Jun-Jie L, Hong Y, et al. Investigation on the structure of TiO_2 films sputtered on alloy substrates. *Vacuum*. 2003;71:487-490.
14. Heracleous E, Lemonidou AA. Ni-Me-O mixed metal oxides for the effective oxidative dehydrogenation of ethane to ethylene-Effect of promoting metal Me. *J Catal*. 2010;270:67-75.
15. Zhu H, Dong H, Laveille P, Saih Y, Caps V, Basset JM. Metal oxides modified NiO catalysts for oxidative dehydrogenation of ethane to ethylene. *Catal Today*. 2014;228:58-64.

INFORMACIONES

XXVIII CONGRESO PERUANO DE QUÍMICA

“Dr. Gastón Pons Muzzo”

Del 29 al 31 de marzo del 2017

PARTICIPANTES INTERNACIONALES CONFIRMADOS PARA LAS PLENARIAS

DR. ÁNGEL GUTIÉRREZ RAVELO

Productos Naturales y Sintéticos (like natural), activos como: antibacterianos, antimaláricos, citotóxicos antitopoisomerasa II, anti MDR, antiparasitarios y estrogénicos.

DR. VALDIR CECHINEL

El género *Phyllanthus* como fuente de compuestos con potencial terapéutico

DR. ALEJANDRO CIFUENTES GALLEGOS

Tecnologías ómicas, alimentos y salud: Alimentómica

DR. ANDRÉS MAURICIO HURTADO BENAVIDES

Estudio del aprovechamiento de residuos agroindustriales del beneficio de café para la obtención de ingredientes naturales para la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

DRA. ELENA IBÁÑEZ EZEQUIEL

Procesos verdes y sostenibilidad. Procesos basados en el empleo de fluidos comprimidos para la revalorización de fuentes naturales.

CURSOS

Como es costumbre, en la realización del CPQ se dictarán diversos cursos con la participación de expositores de reconocida trayectoria.

1. Aprovechamiento de residuos agroindustriales de frutas para la obtención de aceites con potencialidad en la industria cosmética utilizando la tecnología de fluidos supercríticos
Dr. Andrés Mauricio Hurtado Benavides
2. Análisis de alimentos en la era postgenómica: Técnicas avanzadas de análisis y alimentómica.
Dr. Alejandro Cifuentes Gallegos / Elena Ibáñez Ezequiel
3. Fundamentos de la cromatografía gas-líquido y sus aplicaciones
Dra. Melisa Rabanal Atalaya
4. Métodos de evaluación sensorial y su aplicación en la industria cosmética
Dra. Kelly Esteban Aquino

5. Corrosión interna y atmosférica en la industria

Dr. Claver Guerra Carvalho

6. Anticoagulantes orales no antagonistas de la vitamina K(NOACs) Tratamiento de la fibrilación atrial FA.

Dr. Ángel Gutiérrez Ravelo

ÍNDICE DE MATERIAS
Rev. Soc. Quím. Perú
Vol. 82 - Año 2016

- Actividad antioxidante de metabolitos de flavonoides originados por la microflora del intestino humano, por Felipe Surco-Laos, Manuel Valle Campos, Eddie Loyola, Montserrat Dueñas, Celestino Santos. 28
- Adsorción de azul de metileno en medio acuoso empleando carbones activados y carbones activados modificados con nanopartículas de ZnO, por Diego Navarro Santos, Gerardo Cruz Cerro, John Rimaycuna Ramírez, José L. Solís, Riitta Keiski, Mónica M. Gómez. 59
- Aprovechamiento de pelos de vacuno del proceso de pelambre enzimático de las curtiembres en la remoción de plomo, por Carmen Carola Palomino Amorín, Rocío Vargas Parker, Lizardo Visitación Figueroa. 183
- Calificación de la equivalencia farmacéutica *in vitro* por la metodología HPLC de cuatro medicamentos conteniendo paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas, por Jhonnell Samaniego Joaquín, Gladys Arias Arroyo. 413
- Caracterización parcial de dos proteasas del veneno de la araña casera del Perú *Loxosceles laeta*, por Frank Huari, Fanny Lazo, Dan Vivas, Edith Rodríguez, Armando Yarlequé. 296
- Celdas solares sensibilizadas por colorante basadas en TiO₂ modificado con CuO, por Vanessa C. Martínez, Alcides López, Mónica M. Gómez. 324
- Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de residuos de barrido de calles usando compost, por Lizardo Visitación Figueroa, Freddy J. Rojas, Víctor Meza Contreras, Lisveth Flores del Pino. 162
- Desarrollo de los índices de susceptibilidad electrofílica y nucleofílica, por Said Figueredo López, Manuel Páez Meza, Francisco Torres Hoyos. 232
- Desarrollo de micropartículas de quitosano cuaternizado y entrecruzado para la adsorción de ácido desoxirribonucleico (ADN), por José L. Cconislla Bello, Christian Jacinto, Ily Maza, Martha Jahuira, Alejandra Pando, Holger Mayta, Ana Valderrama. 464
- Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación simultánea de Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida, Cafeína y Clorfeniramina maleato en tabletas, por Jhonnell Samaniego Joaquín, Gladys Arias Arroyo. 196

- Digestibilidad y energía digestible de cinco leguminosas forrajeras tropicales, por Alejandrina Sotelo M., Carlos Contreras M., Edgar Norabuena M., Roxana Castañeda S., Mariella van Heurck, Luz Ballón C. 306
- Efecto del contenido de humedad y temperatura sobre la difusividad térmica en granos andinos, por Nils Huamán Castilla, Gladys Yupanqui, Erik Allcca Alca, Giovanna Allcca 259
- Efecto del corte de cola y tiempo de cuarda sobre las características fisicoquímicas del pisco de uva italia, por Nils L. Huamán Castilla, Geraldine F. Reaño García, Erik E. Allcca Alca. 3
- Elaboración, caracterización electroquímica y estudio motriz de un actuador tricapa, por Saúl Bertel Hoyos, Jairo Segura Bermúdez, Álvaro Arrieta, Yamid Núñez. 208
- Elaboración y optimización de una red de sensores electroquímicos para una lengua electrónica orientada al análisis de leche, por Álvaro Á. Arrieta, Jorge A. Díaz, Oscar C. Fuentes. 152
- Estudio computacional de la reactividad comparada de los aniones tioacetato y tiobenzoato frente al bis-(2,4-dinitrofenil)-éter y al bis-(2,4-dinitrofenil)-sulfuro, por Jorge Cappetta, César Alfonso Micheli. 114
- Estudio de carbones activados impregnados con quitosano y su comparación con carbones comerciales, por Gerardo J. F. Cruz Cerro, Marlene Velásquez Yucra, Julio Santiago Contreras, José L. Solís Veliz, Mónica M. Gómez León, Riitta Keiski. 373
- Estudio de formulaciones cerámicas para aisladores eléctricos, por Víctor Tejada, Dominique Plée. 70
- Estudio de la biosorción de Cd (II) y Pb (II) usando como adsorbente *Nostoc spaericum* Vaucher, por Roberto Carlos Chuquilín Goicochea, Dyana Daysi Rosales Laguna. 47
- Estudio de la biosorción de plomo divalente de soluciones acuosas usando biomasa modificada de marlo de maíz (*Zea mays*), por Carmencita Lavado Meza, Franklin Oré Jiménez. 402
- Estudio fitoquímico de las hojas de *Jacaranda caroba* (Vell.) DC., por Ingrit Elida Collantes Díaz, Elfriede Marianne Bacchi. 364
- Evaluación de las propiedades químicas y mecánicas de biopolímeros a partir del

- almidón modificado de la papa, por Alarcón Cavero, Hugo Arturo; Arroyo Benites, Edmundo. 313
- Evaluación de ocratoxina A en *Theobroma cacao* L. “cacao blanco” durante el proceso de cosecha, fermentado, secado y almacenado, por Norma Ramos, Américo Castro, José Juárez, Otilia Acha de la Cruz, Nadia Rodríguez, Jesús Blancas, Jackeline Escudero, Arnaldo Navarro. 429
 - Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) de diferentes lugares del Perú, por Bertha Jurado Teixeira, Isabel Mercedes Aparcana Ataurina, Leydi Steffani Villarreal Inca, Eva Ramos Llica, María Rosario Calixto Cotos, Paola Estefania Hurtado Manrique, Katherin María del Carmen Acosta Alfaro. 272
 - Evaluación del impacto en la calidad de agua debido a la producción semi intensiva de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) en jaulas flotantes en la Laguna Arapa – Puno, por Wilfredo Vásquez Quispesivana, María Talavera Núñez, Marianela Inga Guevara. 14
 - Evaluación del proceso de remoción de Cr(VI) con compost de residuos de cultivo de clavel en disoluciones acuosas, por Elianna Castillo, Claudia Vargas, Pedro F. B. Brandão, Jesús Ágreda. 389
 - Evaluación y tratamiento de efluentes del remojo convencional y enzimático de pieles, por precipitación de proteínas y coagulación, por Yasmin Liseth Castañeda C., Rocío Vargas P., Mary Flor Césare C., Lizardo Visitación F. 438
 - Fabricación y caracterización de celdas solares sensibilizadas de TiO₂ modificado con nanopartículas de NiO, por María Galicia Toralva, J.L. Solis, M.M. Gómez. 84
 - Funcionalización de textiles de algodón con nanopartículas de ZnO₂, por L. Esmeralda Román Mendoza, Carmen Uribe Valenzuela, Dora Maurtua Torres, Elsa Roca Meneses, Marco Brañez Sánchez, Jessica Álvarez Alayo, José L. Solis Veliz y Mónica M. Gómez León. 216
 - Influencia de la presencia de borras durante el tiempo de reposo del vino base sobre algunos compuestos volátiles del pisco peruano de uva Italia, por Yasser Hidalgo, Beatriz Hatta, Juan Carlos Palma. 280
 - Influencia del nivel de fermentación del vino base sobre algunos compuestos volátiles del pisco peruano de uva Italia, por Yasser Hidalgo, Beatriz Hatta, Juan Carlos Palma. 128
 - Interacciones del ácido DL-2-aminobutírico en soluciones acuosas de nitrato de

- sodio a varias temperaturas, por Manuel S. Paéz M., Dairo E. Pérez S., Oscar Julio M. 245
- Microextracción en fase sólida (SMPE) de compuestos volátiles del género *Origanum*, por Nils Huamán Castilla, Erik Allecca Alca, Gregorio Arroyo, José Quintana. 105
 - Modificación ácida del carbón activado y la influencia del grupo sustituyente en la adsorción de compuestos fenólicos, por Edwin Javier Aylas Orejón, Gino Picasso Escobar, María del Rosario Sun Kou. 339
 - Modificación de poliuretanos químicamente activos mediante poli(vinilbencil-N-metil-D-glucamina) para la retención de boro, por Manuel Palencia, Enrique Combatt, Alvaro Arrieta. 325
 - Optimización del proceso de inmovilización de lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27 en octadecilo-sepabead, por Yadira Fernández Jeri, Amparo I. Zavaleta, Ana María Muñoz Jáuregui. 476
 - Optimización del proceso Fenton en el tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios, por Carlos Javier Medina Valderrama, Edgar Michel Montero del Aguila, Liz Erika Cruz Pio. 451
 - Propiedades energéticas de la harina de maca, por Violeta Romero, Arminda Tirado, Mónica Durán, Juan Z. Dávalos. 37
 - Purificación y caracterización de una hemorragina de alto peso molecular presente en el veneno de la serpiente *Bothrops pictus*, por Candy Bellido, Fanny Lazo, César Ortiz, Edith Rodríguez, Armando Yarlequé. 142
 - Síntesis de catalizadores basados en óxidos mixtos de Ni-Ti para la producción de etileno a partir de la deshidrogenación catalítica del etano, por Daisy Unsihuaya, Gino Picasso, Rosario Sun Kou. 487
 - Síntesis de posibles agonistas nicotínicos con potencial actividad insecticida, por Luis J. Reyes-García, Pía Cid. 175

ÍNDICE DE AUTORES
Rev. Soc. Quím. Perú
Vol. 82 - Año 2016

Acha D., Otilia	431	Escudero, Jackeline	431
Acosta A., Katherin M.	272		
Ágreda, Jesús	389	Fernández J., Yadira	480
Alarcón C., Hugo A.	313	Figueredo L, Said	232
Allcca A., Erik E.	3, 105, 259	Flores D., Lisveth	162
Allcca, Giovanna	259	Fuentes, Oscar C.	152
Álvarez A., Jessica	216		
Aparcana A., Isabel M.	272	Gómez, Mónica M	59, 84, 216, 324, 373
Arias A., Gladys	196, 415		
Arrieta, Álvaro A.	152, 208, 325	Hatta, Beatriz	280
Arroyo B., Edmundo	313	Hidalgo, Yasser	128, 280
Arroyo, Gregorio	105	Huamán C., Nils	3, 105, 259
Aylas O., Edwin J.	339	Huari, Frank	296
		Hurtado M., Paola E.	272
Bacchi, Elfriede M.	364		
Ballón C., Luz	306	Inga G., Marianela	14
Bellido, Candy	142		
Bertel H., Saúl	208	Jacinto, Christian	467
Blancas, Jesús	431	Jahuir, Martha	467
Brandão, Pedro F. B.	389	Juárez, José	431
Brañez S., Marco	216	Jurado T., Bertha	272
Calixto C., Rosario	272	Keiski, Riitta	59, 373
Cappetta, Jorge	114		
Castañeda C., Yasmín L.	440	Lavado M., Carmencita	403
Castañeda S., Roxana	306	Lazo, Fanny	142, 296
Castillo, Elianna	389	López, Alcides	324
Castro, Américo	431	Loyola, Eddie	28
Cconislla B., José L.	467		
Césare C., Mary F.	440	M., Oscar J.	245
Chuquilín G., Roberto C.	47	Martínez, Vanessa C.	324
Cid, Pía	175	Maurtua T., Dora	216
Collantes D., Ingrit E.	364	Mayta, Holger	467
Combatt, Enrique	325	Maza, Ily	467
Contreras M., Carlos	306	Medina V., Carlos J.	454
Cruz C., Gerardo	59, 373	Meza C., Víctor	162
Cruz P., Liz E.	454	Micheli, César A.	114
		Montero D., Edgar M.	454
Dávalos, Juan Z.	37	Montserrat D., Celestino S.	28
Díaz, Jorge A.	152	Muñoz J., Ana M.	480
Durán, Mónica	37		

Navarro S., Diego	59	Uribe V., Carmen	216
Navarro, Arnaldo	431	Valderrama, Ana	467
Norabuena M., Edgar	306	Valle C., Manuel	28
Núñez, Yamid	208	Van Heurck, Mariella	306
		Vargas P., Rocío	183, 440
Oré J., Franklin	403	Vargas, Claudia	389
Ortiz, César	142	Vásquez Q., Wilfredo	14
		Velásquez Y., Marlene	373
Paéz M., Manuel S.	232, 245	Villarreal I., Leydi S.	272
Palencia, Manuel	325	Visitación F., Lizardo	162, 183, 440
Palma, Juan C.	128, 280	Vivas, Dan	296
Palomino A., Carmen C.	183		
Pando, Alejandra	467	Yarlequé, Armando	142, 296
Pérez S., Dairo E.	245	Yupanqui, Gladys	259
Picasso E., Gino	339, 491		
Plée, Dominique	70	Zavaleta, Amparo I.	480
Quintana, José	105		
Ramos L., Eva M.	272		
Ramos, Norma	431		
Reaño G., Geraldine F.	3		
Reyes G., Luis J.	175		
Rimaycuna R., John	59		
Roca M., Elsa	216		
Rodríguez, Edith	142		
Rodríguez, Edith	296		
Rodríguez, Nadia	431		
Rojas, Freddy J.	162		
Román M., L. E.	216		
Romero, Violeta	37		
Rosales L., Dyana D.	47		
Samaniego J., Jhonnell	196, 415		
Santiago C., Julio	373		
Segura B., Jairo	208		
Solis, José L.	59, 84, 216, 373		
Sotelo M., Alejandrina	306		
Sun K., María	393, 491		
Surco L., Felipe	28		
Talavera N., María	14		
Tejada, Victor	70		
Tirado, Arminda	37		
Toralva, María G.	84		
Torres H., Francisco	232		
Unsihuay, Daisy	491		



XXVIII CONGRESO PERUANO DE QUÍMICA

Marzo 2017, Lima - Perú