

ISSN 1810-634X

# REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 84 N° 2  
ABRIL - JUNIO 2018



INSTITUCIÓN CIENTÍFICA FUNDADA EN 1933

LIMA, PERÚ

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

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

**Comisión de Economía y Finanzas**

Presidenta: Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo

**Comisión de Publicaciones**

Presidenta: Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón

**Comisión de Actuaciones Científicas**

Presidenta: MSc. Luz Castañeda Pérez

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

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

**REVISTA**  
**de la**  
**SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**

**(Rev Soc Quím Perú)**

**ISSN 1810 – 634X**

**Revista Trimestral**

**Comité Editor**

**Editor en Jefe** : Ana Cecilia Valderrama Negrón

**Miembros** : Julio Santiago Contreras

Lisveth Flores Del Pino

Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

**Comité Consultivo**

Alarcón Cavero, Hugo

**Univ. Nac. de Ingeniería, Perú**

Caramatin 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**

De La Cruz Azabache, Mario

**Univ. Nac. de Ingeniería, Perú**

Gamboa Fuentes, Nadia

**Pontificia Universidad Católica del Perú**

Guija Poma, Emilio

**Universidad Científica del Sur – Perú**

Lock Sing, Olga

**Pontificia Universidad Católica del Perú**

Lon Kan Prado, Elena

**Universidad Le Cordon Bleu**

Muñoz Jáuregui, Ana

**Universidad San Ignacio de Loyola**

Picasso Escobar, Gino

**Univ. Nac. de Ingeniería, Perú**

Rabinovich Jaitin, Daniel

**University of North Carolina, USA**

Rueda Sánchez, Juan Carlos

**Pontificia Universidad Católica del Perú**

Sun Kou, María del Rosario

**Dpto. Ciencias, Sec. Química PUCP**

**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](mailto:sqperu@gmail.com)

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

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

**Certificado N° 95-1567**

---

**Vol 84**

**ABRIL - JUNIO 2018**

**N° 2**

En el Perú: N° suelto S/.15

Suscripción anual: S/. 60.00

En el extranjero: Suscripción anual: \$50.00



**CONTENIDO**  
**(Vol. 84 – N° 2 – 2018)**

<b>Editorial</b> .....	173
<b>Trabajos Originales</b>	
- Estudio fitoquímico cualitativo preliminar y cuantificación de flavonoides y taninos del extracto etanólico de hojas de <i>Desmodium vargasianum</i> Schubert. Por Diana R. Rengifo Zevallos	175
- Mejora de las propiedades adsorptivas de biomateriales mediante modificaciones químicas en la eliminación de antibióticos. Por Jesie C. Silva, Lizebel Morante, Carlos J. Moreno, Norma A. Cuizano, Abel E. Navarro, Bertha P. Llanos	183
- Aislamiento del ácido lecanórico y ácido úsnico del líquen <i>Umbilicaria calvescens</i> NyL. Por Judith Ramos Chávez, Elena A. Córdor Cuyubamba	197
- Caracterización por técnicas espectroscópicas del O-carboximetilquitosano obtenido por derivatización del quitosano. Por Susana Cusihamán Noa, María Elena Talavera Núñez, Carlos Arenas Chávez, David G. Pacheco Salazar, Corina Vera Gonzales	204
- Optimización del rendimiento de la extracción de aceite de semillas de <i>Vitis vinifera</i> con CO <sub>2</sub> supercrítico. Por Maritza Barriga-Sánchez, Anna Churata Huanca, Óscar Tinoco Gómez	217
- Influencia de la concentración de Se(IV) en la viabilidad celular durante el crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Por: Carmen Rodríguez Best, Jesús Américo Cjuno Huanca, Mario Ceroni Galloso	228
- Evaluación de la capacidad acumuladora de Cd(II), Pb(II) y Cr(VI) por colonias de <i>Nostoc commune</i> "Murmunta" Por: Stamber Ramírez Revilla, Jeaneth Medina Pérez, José Villanueva Salas	239
- Desarrollo de electrodos de bajo costo basado en óxidos metálicos para la generación de cloro. Por: Daniel Bazán Arista, Angélica María Baena Moncada, Adolfo La Rosa-Toro Gómez.	247
<b>Informaciones</b>	260

---

**Revista Arbitrada**

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

## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

If the authors reside abroad US \$ 110,00

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

## Formato para los artículos

Baje la plantilla de artículo. Los autores pueden solicitar la plantilla de artículo al correo electrónico [sqperu@gmail.com](mailto:sqperu@gmail.com)

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





## Editorial

### EL LITIO: QUE NO SEA OTRA OPORTUNIDAD PERDIDA

Hace unas semanas los medios de comunicación informaron que se había descubierto una mina de litio y uranio a 4 500 metros de altitud al norte del lago Titicaca. Además, se informó que los recursos comprobados corresponderían a cerca de 4,5 millones de toneladas de carbonato de litio, proyectándose para fines del 2020 su producción y para el 2021 la exportación.

La historia del descubrimiento del elemento litio se remonta al año 1800 cuando José Bonifacio Andrada y Silva reportó el descubrimiento de dos minerales, la petalita y el espodumeno encontrados en una mina de Suecia. Años después, en 1817, L. Vauquelin estudió la composición de la petalita y sólo encontró la presencia de potasio. Paralelamente, J. Berzelius se interesó por el estudio de ese mineral y encomendó la tarea a un joven sueco, Johan Augustus Arfwedson, quien por cuidadosas reacciones separó la sílice, después la alúmina, pero luego de hacer el balance de materia observó pérdidas de una sustancia cercanas al 4 %. Siguió con sus experimentos y tras un tratamiento con sulfuro y ácido pudo separar el litio y propuso la composición  $\text{LiAlSi}_4\text{O}_{10}$  para la petalita. Arfwedson no obtuvo el litio metálico por más intentos que realizó, pero sí lo obtuvo Humphry Davy por el proceso de electrólisis de  $\text{Li}_2\text{O}$  en 1818.

El litio es un elemento estratégico por su escasez en la corteza terrestre y sus propiedades como el ser el metal más ligero que existe, ser blando, tener bajo punto de fusión, alto calor específico, alta conductividad térmica y eléctrica, baja densidad y ser muy electropositivo. Por esta última propiedad el litio no está como litio metálico en la naturaleza sino como  $\text{Li}^+$  en algunos silicatos, fluorosilicatos, aluminosilicatos, fosfatos, haluros y boratos. También está presente en salmueras, aguas termales y agua de mar. Solo los pocos yacimientos de litio tienen importancia económica; por ejemplo, en América del Norte el yacimiento más importante es un silicato doble de litio y aluminio. Sin embargo, en América del Sur se presenta el litio principalmente en las salmueras.

Por otro lado, las aplicaciones que tiene el litio y sus compuestos son muy variadas: baterías de iones litio (usadas en los automóviles eléctricos, teléfonos, tabletas y demás dispositivos), depuradores de aire, grasa para motores, espejos especiales, vidrios y cerámicas, prótesis dentales, aleaciones diversas y medicamentos.

Dada la importancia que tiene el litio en la tecnología actual se tiene que realizar una serie de acciones para que el Perú utilice y explote este recurso para sacarle el máximo provecho. La meta no debe ser explotar este recurso minero tal como lo hemos hecho con el oro, plata, cobre y hierro, que si bien es cierto son el motor de nuestra economía no nos enriquece como debería, porque seguro con más tecnología nos sacarían de la pobreza en pocos años. Asimismo, se debe incidir en la protección ambiental para evitar conflictos como los que tenemos con otros yacimientos.

Siendo la industria de la energía vital para la tecnología, sería deseable que el Perú pueda incursionar en la fabricación de baterías de iones litio y también en la obtención de derivados químicos de litio (carbonato, cloruro, bromuro, estearato e hidróxido de litio) de importancia industrial. Para ello se necesita orientar la política e incentivos tecnológicos con tal de lograr científicos, tecnólogos y técnicos altamente entrenados de primer nivel. Asimismo, se requiere incentivar a las empresas peruanas en base a políticas de estado realistas. No debemos olvidar que pueden ser oportunidades para muchos emprendimientos. Por ello, se requiere la cooperación entre el Ministerio de la Producción, Ministerio de Energía y Minas, Ministerio del Ambiente, el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, universidades y empresas para lograr la máxima explotación de dicho recurso en beneficio del país.

Dr. Mario Ceroni Galloso  
Miembro Titular de la Academia Nacional de Ciencias (Perú)

## ESTUDIO FITOQUÍMICO CUALITATIVO PRELIMINAR Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y TANINOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Desmodium vargasianum* Schubert

Diana R. Rengifo Zevallos\*

### RESUMEN

En este trabajo se investigó los principales metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de hojas de *Desmodium vargasianum* Schubert “pie de perro”. El tamizaje fitoquímico realizado en el extracto etanólico sugiere la presencia de compuestos fenólicos (flavonoides, taninos) y alcaloides. Se realizó la cromatografía en capa fina, dando positivo flavonoides, taninos y alcaloides. Finalmente se cuantificaron flavonoides totales y taninos totales. En la cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría UV-VIS se obtuvo  $202,05 \pm 1,10$  mg QE/g de extracto etanólico (EE). En cuanto a la cuantificación de taninos totales por espectrofotometría UV-VIS se obtuvo  $178,50 \pm 0,75$  mg ATE/g de EE.

**Palabras clave:** *Desmodium vargasianum* Schubert, polifenólicos, flavonoides, taninos y alcaloides.

## PRELIMINARY QUALITATIVE FITOCHEMICAL STUDY AND QUANTIFICATION OF FLAVONOIDS AND TANNINS OF ETHANOLIC EXTRACT OF LEAVES OF *Desmodium vargasianum* Schubert

### ABSTRACT

In this work the secondary metabolites of *Desmodium vargasianum* Schubert “pie de perro” leaves ethanolic extract was investigated. The phytochemical screening realized on the ethanolic extract suggests the presence of phenolic compounds (flavonoids, tannins) and alkaloids. The thin layer chromatography was positive for flavonoids, tannins and alkaloids. Finally, total flavonoids and total tannins were quantified. In the quantification of total flavonoids by UV-VIS spectrophotometry,  $202,05 \pm 1,10$  mg QE/g of ethanolic extract (EE) was obtained. As for the total tannins quantification by UV-VIS spectrophotometry,  $178,50 \pm 0,75$  mg TAE/g EE was obtained.

**Key words:** *Desmodium vargasianum* Schubert, polyphenolics, flavonoids, tannins and alkaloids.

\*Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Jr. Puno 1002, Lima, Perú, soludimes@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

La planta *Desmodium vargasianum* Schubert pertenece a la familia Fabácea, es una especie nativa que crece en Perú, Ecuador y Bolivia. En Perú crece en los departamentos de Ancash, Apurímac, Ayacucho, Cusco, Huancavelica, La Libertad, Lambayeque, Lima y Piura. Esta planta es un subarbusto conocida con los nombres comunes de “pie de perro” y “pega pega”, es considerada como planta endémica<sup>1,2,3</sup>. El estudio etnobotánico de la planta, reportado en la literatura, hace referencia que las hojas se utilizan en decocción como calmante, diurética, contra enfermedades hepáticas, depurador del riñón y para dolores musculares, así como desinflamante<sup>2</sup>. En la provincia de Sullana, del departamento de Piura del Perú, esta planta es conocida como “miñate” y es de utilidad forrajera para el ganado<sup>4</sup>.

Los flavonoides son metabolitos secundarios que se encuentran presentes en las plantas, los cuales tienen una estructura química de quince carbonos con dos anillos benceno unidos a través de un anillo pirano heterocíclico. Los flavonoides se clasifican de acuerdo a su estado de oxidación y patrón de sustitución del anillo pirano en flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavononas, flavononoles y flavan-3-oles, mientras que los compuestos individuales dentro de una clase difieren en el patrón de sustitución de los anillos benceno. Los flavonoides son de especial interés en la investigación de productos naturales por presentar actividad biológica, tales como antioxidante, antiinflamatorio, hepatoprotector, antibacteriano y antiviral<sup>5</sup>.

Los alcaloides son compuestos nitrogenados, por lo general heterocíclicos básicos y con actividad biológica diversa. Las especies del género *Desmodium* pueden contener alcaloides tales como salsolina, salsolidina (tetrahidroisoquinolinas), derivados de  $\beta$ -fenetilaminas<sup>6</sup> y derivados de triptamina<sup>7</sup>. En *Desmodium gyrans* fueron identificados 2 alcaloides, uno de estructura isoquinolínica (1-[(3,4-dietoxifenil) metil]-<sup>6,7</sup>-dietoxi-isoquinolina) y el otro pirazolinico (3,4-dimetil-4-nitro-2-pirazolina-5-ona)<sup>8</sup>.

Los taninos son compuestos polifenólicos que se encuentran presentes como metabolitos secundarios en varias especies vegetales. Los taninos según su estructura química se clasifican en dos grupos: hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables son ésteres de ácido gálico y ácido elágico glicosilados y los taninos condensados o proantocianidinas son polímeros de flavan-3-ol y/o flavan-3,4-diol. Los taninos según su estructura química presentan diferentes efectos farmacológicos tales como antioxidante y antimicrobiano, con actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* y *Shigella dysenteriae* y efecto cicatrizante<sup>9</sup>.

Los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Determinar cualitativamente los principales metabolitos secundarios mediante el tamizaje fitoquímico y la cromatografía en capa fina del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* Schubert 2) Cuantificar el contenido de flavonoides y taninos totales del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* Schubert.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Muestra

La especie vegetal *D. vargasianum* Schubert, "pie de perro", fue recolectada en la provincia de Huarochirí del departamento de Lima, a 1100 msnm en el mes de agosto del 2015, durante la etapa de floración. La clasificación taxonómica de la planta fue realizada en el herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el biólogo Severo Baldeón Malpartida.

La planta fue secada a la sombra a temperatura ambiente por dos semanas, se utilizó papel kraft, cambiándose de papel cada 24 horas. Se seleccionaron las hojas secas y fueron pulverizadas en un molino de cuchillas tipo Wiley. Se incorporó el polvo de hojas secas en frasco de vidrio estéril de color ámbar con tapa de polipropileno de color negro.

Se determinó la humedad de la planta mediante el método gravimétrico<sup>10</sup>. Se pesó 10 g de la muestra de hojas frescas en balanza analítica OHAUS y se secó hasta peso constante en estufa MEMMERT a 105°C durante 5 horas y se pesó la muestra. Se continuó con el secado y la pesada a intervalos de 1 hora hasta que la diferencia entre dos pesadas sucesivas no sea mayor de 0,25 %. De igual forma se procedió con las hojas secas, usándose una muestra de 2 gramos.

### Extracto etanólico

Se incorporó 100 g de polvo de hojas secas de *D. vargasianum* Schubert en 1 L de etanol 70° y se maceró dentro del lapso de 24 horas de efectuada la molienda, en frasco ámbar de 2 L protegido de la luz y el calor y se agitó diariamente por 15 días. Luego, se filtró y se llevó a estufa de aire circulante a 40 °C en fuentes de vidrio de pirex. Se desecó en 4 días y se obtuvo un residuo de peso constante que se denominó extracto etanólico.

### Ensayo de solubilidad

De manera secuencial se ordenó y etiquetó los tubos de ensayo con los nombres de los solventes de diferente polaridad<sup>11</sup>. Se introdujo a cada tubo de ensayo 20 mg de extracto etanólico de hojas de *D. Vargasianum* Schubert y en cada tubo se añadió 1mL de solvente (agua destilada, metanol, etanol 96 %, etanol 70 %, diclorometano, cloroformo, n hexano y éter dietílico). Se agitó cada tubo de ensayo y se procedió a observar los resultados de solubilidad por un tiempo máximo de 10 minutos.

### Tamizaje fitoquímico

Se utilizó el extracto etanólico seco de hojas de *D. Vargasianum* Schubert para realizar las pruebas fisicoquímicas de caracterización, de cambios de coloración y formación de precipitados<sup>12</sup>.

### Cromatografía en capa fina

Se realizó la cromatografía en capa fina, usando como fase estacionaria silica gel 60 GF<sub>254</sub> y como fase móvil los solventes n-butanol: ácido acético : agua (BAW) (4:1:5) para confirmar

la presencia de los metabolitos secundarios<sup>11</sup>. Se aplicó la siembra del extracto etanólico seco, previamente reconstituido en etanol 70 % usando capilares nuevos. Los reveladores usados fueron: tricloruro férrico al 1 % para taninos, Dragendorff para alcaloides y tricloruro de aluminio para flavonoides. En el caso de los flavonoides se observó la placa cromatográfica a luz UV de 365 nm antes y después del revelado.

### **Cuantificación de flavonoides totales**

Se cuantificaron los flavonoides totales presentes en el extracto etanólico seco por espectrofotometría a una longitud de onda de 415 nm por triplicado, según literatura<sup>13</sup>. Se preparó la curva de calibración, se pesaron 2,70 mg de quercetina de grado Q.P. y se disolvió con etanol 80 % en cantidad suficiente para 10 mL de solución. Luego se tomó sucesivamente 100  $\mu$ L, 175  $\mu$ L, 350  $\mu$ L y 750  $\mu$ L de la solución preparada previamente para diluirlo con etanol 80 % hasta su enrase respectivo en fioles 10 mL x 4, siendo las concentraciones teóricas de las soluciones estándares de 2,70  $\mu$ g/mL, 4,73  $\mu$ g/mL, 9,45  $\mu$ g/mL y 18,90  $\mu$ g/mL, respectivamente. A cada disolución preparada se añadió 200  $\mu$ L de acetato de sodio 1 M y 200  $\mu$ L de nitrato de aluminio al 10 %, se dejó reposar por 40 minutos y se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV-VIS a 415 nm. Por otro lado, para la preparación de la muestra por triplicado se pesaron 30,9 mg del extracto etanólico seco y se diluyeron en tres fioles de 25 mL con etanol al 80 %. Se tomaron 0,5 mL de cada muestra y se diluyeron a 25 mL. Se tomó una alícuota de 1 mL de cada fiola y se agregaron 200  $\mu$ L de acetato de sodio 1 M y 200  $\mu$ L de solución de nitrato de aluminio al 10 %. Se dejó reposar por 40 minutos. Finalmente, se procedió a leer las absorbancias de las muestras en el espectrofotómetro UV-VIS a 415 nm de longitud de onda. La cantidad de flavonoides fue expresada como mg quercetina equivalente por gramo de muestra.

### **Cuantificación de taninos totales**

Se cuantificaron los taninos totales del extracto etanólico seco por espectrofotometría UV-VIS a 700 nm por triplicado, según literatura<sup>14</sup>. Se preparó previamente una curva de calibración a las concentraciones de 2, 4, 8, 10 y 25 ppm del patrón ácido tánico. Se pesó 0,50 g de extracto etanólico seco y se disolvió en 50 mL de metanol – agua 25:25 v/v. El método consta de dos etapas. En la primera etapa se realizó varias diluciones de la muestra, se adicionó el reactivo de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio al 20 % y se formó un complejo coloreado azul; asimismo, se preparó el blanco, sin la incorporación de la muestra. En la segunda etapa se realizó la separación de taninos usándose gelatina al 25 %, caolín 2,5 % y solución ácida de cloruro de sodio. Se agitó y filtró al vacío, posteriormente se adicionó el reactivo de Folin-Ciocalteu, solución de carbonato de sodio al 20 % y agua desionizada; asimismo, se preparó el blanco, sin la incorporación de la muestra. Se tapó con papel de aluminio y se dejó reposar por 1 hora para la lectura en el espectrofotómetro. Finalmente, se procedió a leer las absorbancias del patrón ácido tánico para elaborar la curva de calibración, luego se realizó la lectura de la muestra de la primera etapa, la cual representa el contenido total de fenoles y la lectura de la muestra de la segunda etapa, que representa el contenido de los fenoles residuales. La cuantificación de los taninos totales se obtiene mediante la resta de las absorbancias de los fenoles totales y los fenoles residuales. El resultado fue expresado como mg de taninos equivalentes de ácido tánico por gramo de muestra.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación del porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad encontrado en las hojas frescas es de 72,90 % y en las hojas secas es de 7,53 %, como se presenta en la tabla 1.

**Tabla 1.** Porcentaje de humedad de hojas frescas y secas de *Desmodium vargasianum*

Muestra: Hojas frescas				
N	Pesafiltro vacío (g)	Muestra humedad (g)	Pesafiltro + Muestra seca	% Humedad
1	24,7752	10,0215	32,0473	72,54 %
2	24,7752	10,0215	32,0157	73,25 %
				Media = 72,90 %
Muestra: Hojas secas				
N	Pesafiltro vacío (g)	Muestra humedad (g)	Pesafiltro + Muestra seca	% Humedad
1	23,1054	2,0324	23,2597	7,59 %
2	23,1054	2,0324	23,2572	7,47 %
				Media = 7,53 %

### Ensayo de solubilidad

Con el ensayo de solubilidad se evidenció que el extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* Schubert es soluble en solventes polares, se presenta en la tabla 2.

### Tamizaje fitoquímico

El método de tamizaje fitoquímico sugiere la presencia de determinados metabolitos secundarios en el extracto etanólico de las hojas de *D. vargasianum* (tabla 3).

**Tabla 2.** Ensayo de solubilidad del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum*

SOLVENTE	RESULTADO
Agua destilada	++
Metanol	+++
Etanol 96 %	+++
Etanol 70 %	+++
Diclorometano	++
Cloroformo	-
n-hexano	-
Éter dietílico	-

Leyenda: -: Insoluble, +: Poco soluble, ++: Soluble, +++: Muy soluble

**Tabla 3.** Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum*

METABOLITO	REACCIÓN	RESULTADO
Carbohidratos	Molish	+
	Antrona	+
Aminoácidos libres y grupos aminos	Ninhidrina	-
Compuestos fenólicos	Tricloruro férrico	+++
Taninos	Gelatina-NaCl	+
Flavonoides	Shinoda	++
Triterpenoides y esteroides	Lieberman- Buchard	+
Naftaquinonas, antraquinonas y antronas	Borntranger	-
Antocianinas	Rosenheim	-
	Mayer	++
Alcaloides	Dragendorff	++
	Wagner	++
Saponinas	Espuma	-
Glucósidos	Vainillina + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> cc	+

Legenda: -: Ausencia, +: Leve, ++: Moderado +++: Abundante

### Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina confirmó la presencia de flavonoides, taninos y alcaloides en el extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* Schubert.

### Cuantificación de flavonoides

La cantidad de flavonoides totales están expresados en mg de quercetina equivalente/g. Se obtuvo 202,05 ± 1,10 mg QE/g de extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum*, la ecuación de la curva de calibración del quercetina patrón fue:  $Y = 0,0399X + 0,0574$ ,  $r^2 = 0,9998$  con  $p < 5\%$ . En relación a la cantidad de flavonoides en plantas del género *Desmodium* se tiene el reporte que presenta diferencias cuantitativas significativas, así tenemos que *D. gran*<sup>15</sup> y *D. gangeticum*<sup>16</sup> se halló que contienen 70,50 ± 2,00 mg QE/g y 37,02 ± 0,15 mg QE/g de extracto metanólico de hojas, respectivamente.

### Cuantificación de taninos

La cantidad de taninos totales están expresados en mg de ácido tánico equivalente/g. Se halló 178,50 ± 0,75 mg ATE/g de extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum*, la ecuación de la curva de calibración del ácido tánico obtenida fue:  $Y = 0,0952X + 0,0493$ ,  $r^2 = 0,9996$  con  $p < 5\%$ , esto representa a 1,80 ± 0,01 g ATE/100 g de hoja seca. La concentración de taninos es muy variable, dependiendo de la especie, tipo de tejido, cultivo, estado de desarrollo y condiciones ambientales. El contenido de taninos totales de especies forrajeras, principalmente de la familia Fabaceae, oscilan entre 1,57 a 9,16 g ATE/100 g de muestra seca<sup>17,18</sup>. El contenido de 2 a 5 % de taninos expresado como ácido tánico equivalente se consideran de moderada concentración, a partir de 6 % se considera de alta concentración, en *Desmodium molliculum* se halló 5,17 ± 0,10 g ATE/100 g de planta seca<sup>19</sup>.



## CONCLUSIONES

1. En el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* Schubert se encontraron compuestos fenólicos (flavonoides, taninos) como componentes mayoritarios, también se observó presencia alcaloides. La presencia de estos metabolitos secundarios fue confirmada mediante cromatografía en capa fina utilizando los reveladores específicos.
2. Se encontró que el extracto etanólico de hojas de *D. vargasianum* Schubert tiene un contenido de flavonoides de  $202,05 \pm 1,10$  mg QE/g y un contenido de taninos de  $178,50 \pm 0,75$  mg ATE/g.

## AGRADECIMIENTO

Agradecimiento al Instituto de Investigación de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” y al Laboratorio de Farmacognosia y Medicina Tradicional de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM por el apoyo brindado durante la realización de esta investigación. Mi agradecimiento al Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera, al Dr. César Máximo Fuertes Ruitón y mi agradecimiento póstumo a la Q.F. Bertha Jurado Teixeira.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baldeón S, Flores M, Roque J. Fabaceae endémicas del Perú en El libro rojo de las plantas endémicas del Perú. *Rev Perú Biol.* 2006; 13(2): 302s - 337s.
2. Mostacero J. Características edafoclimáticas y fitogeográficas de las plantas medicinales del dominio andino noroccidental del Perú, durante 1976 al 2004. [Tesis para optar el grado de doctor en medio ambiente]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2005. 313 p.
3. Cerna LA. Ciencia y tecnología de malezas. 1a ed. Trujillo: Fondo Editorial de la Universidad Privada Antenor Orrego; 2013.
4. Etnobotánica de las especies del monte ribereño en el río Chira, Sullana. [Tesis para optar el título profesional de Biólogo]. Piura: Universidad Nacional de Piura; 2015. 126 p.
5. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Sci World J.* 2013; 2013:1-16.
6. Phillipson JD, Roberts MF, Zent MH. The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids. 1a ed. Berlin: Springer Verlag; 1985.
7. Ganjhu RK, Mudgal PP, Arunkumar G. Pharmacological and Phytoconstituent Profile of *Desmodium Gangeticum*-An Update. *IJPPR.* 2014; 6(3): 643-657.
8. Gopalakrishnan S, Rajameena R. GC-MS. Analysis of some bioactive constituents of the leaves of *Desmodium gyrans* DC. *IRJP.* 2012; 3 (8): 271-274.

9. Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*. 2005; 28 (5): 892-896.
10. Farmacopea de los Estados Unidos 40 – Formulario Nacional 35 (USP 40 - NF 35). (561) Artículos de Origen Botánico. <921> Determinación de Agua. 2017; 1:458-459, 465, 927.
11. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2a ed. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
12. Gorriti A, Córdova A, Jurado B, Ortega EC, Retuerto MG. Manual de Laboratorio de Farmacognosia I. Lima: Cátedra de Farmacognosia y Medicina Tradicional, UNMSM. 2013.
13. Lock O, Cabello I, Doroteo V. Análisis de flavonoides en plantas. Pontificia Universidad Católica del Perú. [online]. 2006 [accesada el 01 de diciembre del 2006]. Disponible en: [http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/](http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/).
14. Lastra H, Rodríguez E, Ponce de León H, González ML. Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. *Rev Cubana Plant Med*. 2000; 5(1):17-22.
15. Vipin PS, Johannah NM, Menon S, Lincy L, Raghavamenon AC, Padikkala J. Antithrombotic and anticoagulant activities of *Desmodium gyrans* (DC). *J Chem Pharm Res*. 2015; 7(5):973-980.
16. Vaghasiya Y, Dave R, Chanda S. Phytochemical analysis of some medicinal plants from Western Region of India. *Res J Med Plant*. 2011; 5(5): 567-576.
17. Yusiati L, Kurniawati A, Hanim C, Anas M. Protein Binding Capacity of Different Forages Tannin. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 2018. doi :10.1088/1755-1315/119/1/012007
18. Alam M, Amin M, Kabir A, Moniruzzaman M y McNeill. Effect of Tannins in *Acacia nilotica*, *Albizia procera* and *Sesbania acculeata* Foliage Determined In vitro, In sacco, and In vivo. *Asian-Aust J Anim Sci*. 2007; 20(2): 220-228.
19. Gutiérrez M, Ortiz D, Muñoz G, Bah M y Serrano V. Contenido de sustancias antinutricionales de malezas usadas como forraje. *Rev Latinoam Quím*. 2010; 38(1): 58-67.

## MEJORA DE LAS PROPIEDADES ADSORPTIVAS DE BIOMATERIALES MEDIANTE MODIFICACIONES QUÍMICAS EN LA ELIMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Jesie C. Silva<sup>a</sup>, Lizebel Morante<sup>a</sup>, Carlos J. Moreno<sup>a</sup>, Norma A. Cuizano<sup>a</sup>,  
Abel E. Navarro<sup>\*b</sup>, Bertha P. Llanos<sup>a</sup>

### RESUMEN

Antibióticos y productos farmacéuticos se han convertido en contaminantes emergentes en aguas residuales debido al bajo control de su comercialización y distribución. En este proyecto se propone el uso de materiales de desecho de hojas de té de manzanilla (CM), té verde (GT) y menta (PM) y sus modificaciones químicas: carboxilación, tiolación y sulfonación como adsorbentes de Penicilina G. Las muestras se sometieron a reacciones químicas sostenibles, en medio acuoso y mínimas de reactivos. Los adsorbentes y sus modificaciones fueron caracterizados mediante técnicas instrumentales. Todos los adsorbentes reportaron estabilidad térmica constante y sólo ligeros cambios morfológicos de superficie. Las pruebas de adsorción demostraron una fuerte influencia de la acidez en la eliminación del antibiótico, sobre todo a nivel de la química de los nuevos grupos funcionales, destacando las interacciones dipolo-dipolo. Los porcentajes de adsorción indican que la tiolación y sulfonación fueron las modificaciones químicas más efectivas, sobre todo en la adsorbente CM, alcanzando %ADS de 27 %, dentro del rango de pH 7-8. La tendencia de máxima adsorción de Penicilina G tiene la secuencia: CMs > PMs ≥ GTs, mientras que las modificaciones químicas siguen la tendencia: Sulfonación ≥ Tiolación > Carboxilación.

**Palabras clave:** Carboxilación, sulfonación, tiolación, hojas de té, antibióticos, adsorción.

---

<sup>a</sup> Sección Química, Departamento de Ciencias Exactas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú.

<sup>b</sup> Science Department, Borough of Manhattan Community College, City University of New York, New York, NY, 10007, USA.

anavarro@bmcc.cuny.edu ; 199 Chambers Street, N699H, New York, NY, 10007, USA

## ENHANCEMENT OF THE ADSORPTIVE PROPERTIES OF BIOMATERIALS BY CHEMICAL MODIFICATION FOR THE ELIMINATION OF ANTIBIOTICS

### ABSTRACT

Antibiotics and pharmaceutical products have become emergent contaminants in residual waters due to the inefficient commercialization and distribution. This study proposes the use of waste materials from tea leaves of chamomile (CM), green tea (GT) and peppermint (PM) and their chemical modifications: carboxylation, sulfonation and thiolation as adsorbents of Penicillin G. The tea samples were treated with sustainable chemical reactions in aqueous media and minimal reagent consumption. The adsorbents and their chemical modifications were characterized by instrumental techniques. All the adsorbents reported constant thermal stability and only small morphological changes on their surfaces. The adsorption tests demonstrated a strong influence of the acidity on the elimination of the antibiotic, mostly at the level of the chemistry of the added functional groups, mainly through dipole-dipole forces. The adsorption percentages indicate that thiolation and sulfonation are the most effective chemical modifications, highlighting CM adsorbents, reaching %ADS of 27%, within the pH range 7-8. The maximum adsorption tendency of Penicillin G has the sequence: CMs > PMs  $\geq$  GTs, whereas the chemical modifications follow the trend: Sulfonation  $\geq$  Thiolation > Carboxylation.

**Key words:** Carboxylation, sulfonation, thiolation, tea leaves, antibiotics

### INTRODUCCIÓN

Cada mañana, antes de acudir a nuestros centros laborales, desde que nos paramos frente a un espejo, usamos productos químicos. Sin darnos cuenta, contribuimos al vertido de estas sustancias a nuestras aguas superficiales. En las últimas décadas, la producción y consumo de productos del cuidado personal y farmacéuticos, tales como lociones, crema de manos, productos de higiene, pasta de dientes, lociones, aceites de protección solar, desinfectantes, repelentes de insectos y otros, se ha incrementado sustancialmente en los países desarrollados y más aún en los países en vías de desarrollo (dado el crecimiento poblacional más acelerado)<sup>1</sup>. De acuerdo con los datos estadísticos internacionales del mercado farmacéutico global, se estimó haber producido medicamentos por valores de \$956 millones en el 2011 y esto incrementó a \$1,2 trillones en el 2013. Solo en los EE.UU. se estima que había 4 millones de prescripciones de medicamentos en el 2009 (ventas a \$300 millones). Además, en los EE.UU., se estima que hay 100 000 medicamentos que no necesitan receta médica. Las ventas del mercado farmacéutico mundial por países fueron: USA 36 %, Europa 31,5 %, Japón 11,3 %, Asia (India, China, Korea), África (Sudáfrica, Nigeria, etc), Australia 12, 7 %, Latinoamérica (Brasil, Argentina, etc) 5,7 % y Canadá 2,8 %<sup>2,3</sup>.

La aparición de los antibióticos en los ambientes acuáticos es un problema eco-toxicológico debido a la potencial alteración del ecosistema. La exposición prolongada a bajas dosis de antibióticos conduce a la proliferación selectiva de las bacterias resistentes, lo que podría transferir los genes de resistencia a otras especies bacterianas<sup>4</sup>. La contaminación de aguas superficiales y agua potable por antibióticos y otros compuestos farmacéuticos han sido reportados en estudios recientes a través de descargas desde sistemas de alcantarillado doméstico<sup>1</sup>.

La eliminación de antibióticos de aguas residuales depende principalmente de las etapas secundarias y procesos avanzados en el tratamiento, ya que los sólidos grandes son fácilmente eliminados por sedimentación. Generalmente, los efluentes de las aguas residuales son tratados por medio de la cloración o radiación ultravioleta; sin embargo, el tratamiento convencional en aguas residuales no está diseñado ni operado para eliminar concentraciones bajas de contaminantes, tales como fármacos, consecuentemente, estos son liberados hacia aguas superficiales<sup>4,5</sup>. En el Perú, el tratamiento de las aguas del río Rímac para la potabilización del agua es la siguiente: (1) captación, (2) desarenadores, (3) pre-cloración, (4) embalses reguladores, (5) dosificación de coagulantes en planta, (6) decantación, (7) filtración, (8) planta de recirculación de agua de lavado de filtros, (9) cloración y (10) reservorios de almacenamiento. En este proceso, estos contaminantes pueden seguir persistiendo durante años ya que sus concentraciones son bajas<sup>6</sup>. De esta manera, los métodos más utilizados son aquellos en que se emplean procesos de adsorción y procesos oxidativos avanzados; en este último se pueden formar productos intermedios como compuestos orgánicos halogenados donde se utiliza el cloro y ozono.

Un problema importante dentro de la categoría de antibióticos son las penicilinas, uno del grupo más importante de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. La penicilina se utiliza comúnmente como materia prima para la producción de penicilinas semi-sintéticas y son extremadamente eficaces y todavía se utilizan ampliamente en aplicaciones veterinarias y en medicina humana, de modo que su eliminación indiscriminada al medio ambiente podría eventualmente reducir su eficiencia en estos campos por el aumento de la resistencia de la penicilina a patógenos en humanos y animales<sup>7</sup>.

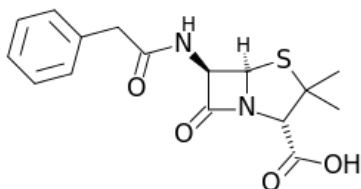
Frente a este problema latente, la comunidad científica, encabezada por la biorremediación, se encuentra en la constante búsqueda de alternativas sostenibles y de bajo costo para eliminar contaminantes, ya sean orgánicos o inorgánicos<sup>8</sup>. La biosorción, como área de la biorremediación, es una tecnología efectiva para eliminar elementos metálicos y compuestos orgánicos de soluciones acuosas mediante el uso de materia no viviente. La biosorción involucra procesos fisicoquímicos basados en mecanismos complejos de reacción de adsorción, reacción de intercambio iónico con grupos funcionales en la superficie celular y acomplejamiento superficial<sup>8,9</sup>. A manera de comparación, existen otras tecnologías convencionales para eliminar trazas de contaminantes, como precipitación química, evaporación, galvanoplastia, adsorción e intercambio iónico, pero la biosorción tiene grandes ventajas como la alta eficiencia y bajo costo de la transformación de estos materiales en

biosorbentes debido a que son económicos, entre ellos algas, hongos, lodos activados, etc. El uso de biomasa no viva evita problemas de contaminación, de igual manera que no afecta la cadena trófica porque se pueden regenerar<sup>8,9</sup>.

En el presente proyecto se investigó el uso de materiales de desecho (hojas de té) luego del proceso de infusión. Estas muestras constituyen una materia rica en carbohidratos, formado por una diversidad de grupos químicos funcionales tales como alcoholes, aminas, ésteres, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas y otros grupos que se han caracterizado por su alta densidad electrónica y su capacidad de atraer centros positivamente cargados. Estos materiales ligno-celulósicos han sido utilizados previamente en la eliminación de metales pesados<sup>10-12</sup> y contaminantes orgánicos<sup>13-15</sup> con resultados positivos. De acuerdo a estos estudios, la capacidad de adsorción de estos biomateriales reside en la presencia de grupos altamente polares como hidroxilo, carboxilo, amino y carbonilo que actúan como centros de atracción de los iones metálicos y de grupos polares de los contaminantes orgánicos<sup>10-15</sup>. Estos hallazgos sirvieron de premisa para este proyecto, en la búsqueda de la mejora de la adsorción mediante la sobrepoblación de los adsorbentes con estos grupos funcionales polares mediante la modificación química. Se propone que la carboxilación, sulfonación y tiolación de estos biomateriales conllevan una mayor afinidad de contaminantes.

Para este estudio se tomó como prioridad antibióticos, dada la importancia que han tomado en la Comunidad Europea y en la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU.<sup>8,16</sup>. Estos países sostienen que los antibióticos son compuestos de degradación que contribuyen al incremento de la resistencia bacteriana y por lo tanto inhiben la acción de los antibióticos actualmente disponibles. A largo plazo, nuestros antibióticos no serán efectivos, y las enfermedades serán más difíciles de combatir. Los antibióticos no solo son usados por humanos, sino también para uso veterinario. Por lo tanto, este proyecto se focaliza en el estudio de la eliminación del antibiótico Penicilina G (de uso humano). La estructura química de este antibiótico se muestra en la figura 1.

Dados nuestros resultados preliminares, decidimos empezar este proyecto de dos maneras: primero, la factibilidad de eliminar antibióticos por métodos de adsorción y segundo la optimización del proceso de adsorción mediante la modificación química de nuestros materiales de desecho de hojas de té de manzanilla (CM), té verde (GT) y menta (PM) que nos permita eliminar la mayor cantidad de antibiótico.



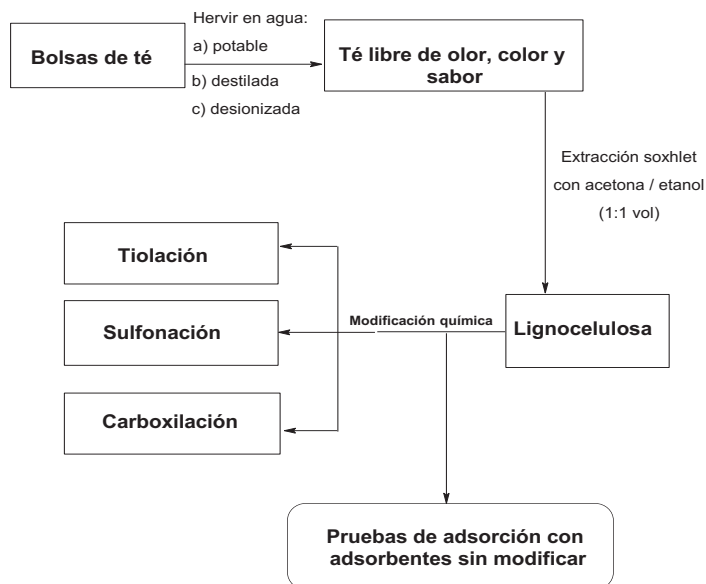
**Figura 1.** Estructuras químicas de Penicilina G

## PARTE EXPERIMENTAL

### Acondicionamiento y modificación química de los adsorbentes

Se compró bolsas de té filtrante de manzanilla (CM), té verde (GT) y menta (PM) de un mercado local en Nueva York, EE.UU.

Esquema 1. Acondicionamiento de hojas de té



### Pre-tratamiento de las muestras antes de su modificación química

Si bien la infusión en agua potable, destilada y desionizada asegura la liberación de impurezas de las muestras de té; sin embargo, existen residuos biológicos propios de las plantas como clorofila y tintes que son parte de la estructura de las mismas. Por lo tanto, fue necesario extraer estos compuestos poco solubles en agua que no fueron eliminados con agua caliente, para asegurarnos que la modificación química le ocurría exclusivamente a los polímeros ligno-celulósicos y no a la clorofila y/o tintes de las hojas.

Para ello, se condujo una extracción continua del tipo Soxhlet con una mezcla de acetona/etanol. La extracción fue exitosa y se extrajo todo tinte. La nueva muestra se mostraba como pura celulosa y carbohidratos estructurales. La extracción en agua hirviendo y por Soxhlet se muestra en la figura 2. Luego de la extracción Soxhlet, las muestras se secaron nuevamente en la estufa a la misma temperatura previamente reportada y luego almacenada en envases de vidrio hasta su uso en la modificación química.

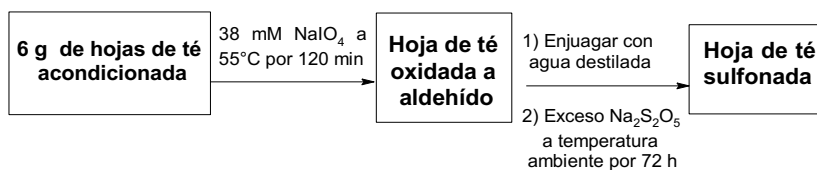


**Figura 2.** Extracción agua hervida (izquierda) y por el método Soxhlet (derecha)

### **Modificaciones químicas de las muestras de té: Carboxilación, sulfonación y tiolación**

Las muestras obtenidas del proceso Soxhlet fueron usadas para la modificación química. Los adsorbentes resultantes fueron designados de la siguiente manera: manzanilla carboxilada (CCM), manzanilla sulfonada (SCM) y manzanilla tiolada (TCM); menta carboxilada (CPM), menta sulfonada (SPM) y menta tiolada (TPM); té verde carboxilada (CGT), té verde sulfonada (SGT) y té verde tiolada (TGT).

**Esquema 2.** Sulfonación de las hojas de té acondicionadas<sup>17</sup>

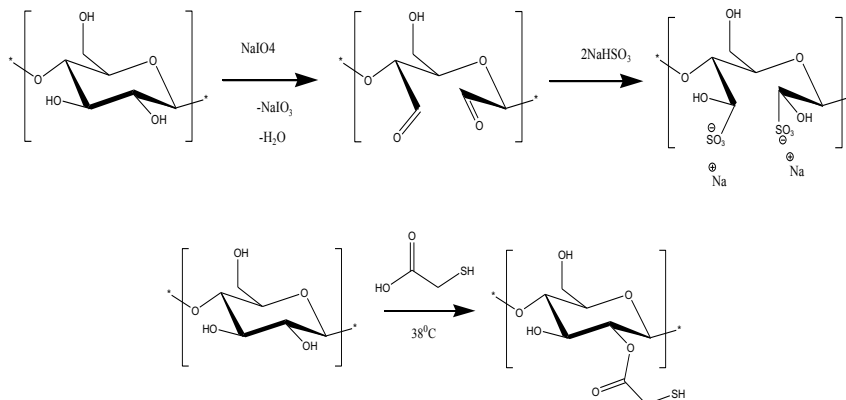


Para insertar grupos tioles, T, la biomasa se pre-trató en 300 mL de solución de NaOH al 1 % y 300 mL de etanol a temperatura ambiente (25°C) durante 24 h. Este proceso se utilizó para eliminar pigmentos de clorofila y otros compuestos de bajo peso molecular. Después de la decantación y filtración, la biomasa tratada se lavó doblemente con agua destilada hasta que la solución alcanzó un valor de pH neutro, y luego se secó a 70°C dentro de una estufa. A continuación, se agitó en 1000 mL de ácido mercapto-acético (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S) al 1 % durante 12 h a temperatura ambiente (25 °C). Después de la decantación y filtración, el producto se lavó adicionalmente con agua destilada hasta que la solución alcanzó un valor de pH neutro. También se secó a 70 °C dentro de una estufa durante toda la noche<sup>18</sup>.

Finalmente, para insertar grupos carboxílicos, la biomasa se añadió a una solución de agua destilada con ácido cítrico e hipofosfito de sodio bajo agitación por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión se sometió a secado a 55°C y después de 24 h la temperatura se aumentó a 120°C por un intervalos de 30 a 110 minutos. Después se lavó con agua destilada tres veces y se secó a 55°C por 24 h<sup>19</sup>.



Luego de las modificaciones químicas, las muestras fueron almacenadas en frascos de vidrio hasta su uso en las pruebas de adsorción y caracterización.



**Figura 3.** Reacciones químicas para la modificación de las muestras de té. (Arriba) sulfonación y (abajo) tiolación.

### Caracterización de las muestras de té nativo y químicamente modificado por técnicas clásicas e instrumentales

La caracterización de los materiales nativos y modificados se realizó mediante técnicas instrumentales. La presencia de los grupos funcionales incorporados (carboxilo, sulfonilo y tiol) fueron corroborados por espectroscopia infrarroja. La textura y morfología de los adsorbentes antes y después de la modificación química fue estudiada mediante espectroscopia de barrido electrónico. Y, finalmente, la estabilidad y resistencia térmica y mecánica fue monitoreada por análisis termo-gravimétrico.

Los estudios de espectroscopia de infrarroja (FTIR) se realizaron con un equipo FTIR modelo Frontier de Perkin Elmer, con la ayuda de un accesorio de ATR para medir muestras en el estado sólido. Las microscopias de barrido electrónico se realizaron mediante el uso de un Scanning electron microscope (SEM) modelo TM3000 de Hitachi. No se necesitó la cubierta de oro y las muestras se estudiaron directamente en el instrumento. Finalmente, el análisis termo-gravimétrico (TGA) se llevó a cabo mediante un equipo modelo STA 6000 de Perkin Elmer. Las condiciones del experimento fueron en atmosfera de nitrógeno, a un flujo de calor de 5°C/min. Cada TGA requirió entre 7-10 mg de muestra, en un rango de temperatura de 30-600 °C.

### Evaluación del efecto de la acidez en la adsorción de Penicilina G

Para determinar el efecto del pH en la capacidad de adsorción de una determinada cantidad de adsorbente se preparó suficiente cantidad de solución del antibiótico de una determinada concentración (50ppm), se separaron en varios recipientes de plástico y cada uno se ajustó a pH de 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, con soluciones diluidas de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio.

Luego, se pesaron 50mg de adsorbente y se agregó 50mL de una solución ajustada a un determinado pH, se repitió el mismo proceso para las otras soluciones de distintos pH, los ensayos se realizaron por duplicado. Luego, estos se colocaron en un agitador a 250 rpm durante 24 horas, tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio. Al término de la agitación, se separaron las partículas de adsorbente de la solución mediante filtración y se procedió a determinar el contenido de penicilina G adsorbida por la técnica de espectrofotometría UV-Visible, tanto para las soluciones remanentes como de los blancos a una longitud de onda de 220 nm.

### **Procesamiento de los datos experimentales**

La cuantificación de Penicilina G se expresó en porcentaje de adsorción (%ADS) de acuerdo a la ecuación 1:

$$\%ADS = \frac{(c_i - c_{eq}) * 100}{c_i} \quad (1)$$

donde  $C_i$  y  $C_{eq}$  son las concentraciones iniciales y al equilibrio de Penicilina en las soluciones. El tratamiento matemático y estadístico se realizó mediante los paquetes Microsoft Office, EXCEL y el paquete estadístico ORIGIN, de OriginLab. Se calcularon las desviaciones estándar de las pruebas de adsorción y se encontraron por debajo del 5 % de error para todos los experimentos. Barras de error no se añadieron a los gráficos para evitar congestiónamiento de la imagen.

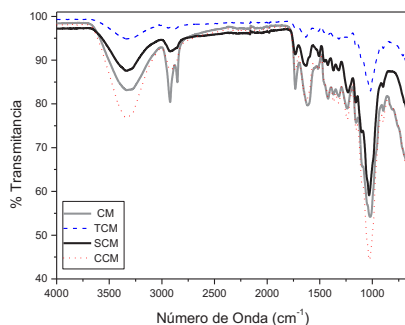
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las muestras de té nativas y modificadas fueron preparadas y no existieron problemas técnicos ni de resistencia del material frente a las condiciones de las reacciones químicas. Hubo cierta pérdida de masa de los adsorbentes antes y después de la modificación química de alrededor del 15-20 % de la masa inicial, pero esta pérdida era predecible dada la extracción Soxhlet y el tratamiento de la lignocelulosa en medio ácido (para todas las modificaciones químicas).

### **Análisis de grupos funcionales por espectroscopia de infrarrojo (FTIR)**

Se realizaron espectros de FTIR de todas las muestras nativas y sus modificaciones químicas. Parte de los resultados para la manzanilla y derivados se muestra en la figura 4. De los resultados se evidencia cambios en los grupos funcionales de la manzanilla. Por ejemplo, se evidencia cambios sustanciales en la intensidad del pico alrededor de 3300 (presencia de grupos hidroxilo – alcohol). CCM reporta el pico más intenso, debido al aumento de grupos carboxilo COOH, que debe incrementar la señal de OH en el FTIR. Por otro lado, SCM y TCM muestran un acortamiento de la señal del -OH a 3300. Esto se justifica debido a la reducción de grupos alcohol (-OH) para permitir la incorporación de -SH y -SO<sub>3</sub>H. También cabe resaltar la disminución de la intensidad de los picos -CH sp<sup>3</sup> alrededor de 2950 para los adsorbentes modificados. Este cambio se podría sustentar por la hidrólisis parcial de ciertos esteres (que poseen grupos alquilo) durante las modificaciones químicas. Recordemos que la modificación química es en condiciones ácidas, lo cual promueve la pérdida (hidrólisis) de esteres, causando pérdida de grupos alquilo, y por ende reducción de la señal en 2950.

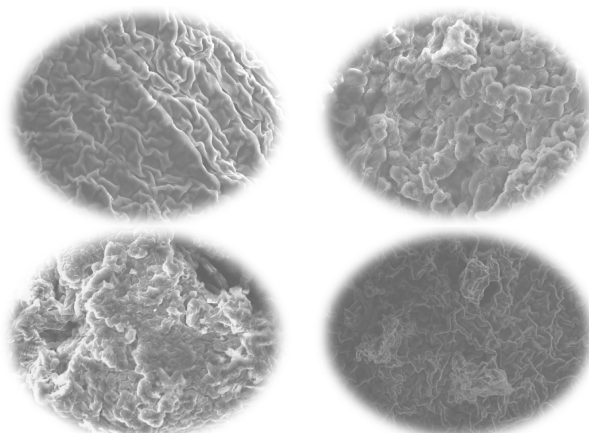
Lamentablemente, los grupos tiol y sulfonilo no son claramente hallados en el espectro FTIR debido a que sus picos aparecen en la región del “fingerprint”, la cual es muy saturada de picos, que impiden una determinación exacta. Sin embargo, los cambios en los grupos –OH, evidencian que hubo un cambio en la estructura. Resultados similares se obtuvieron para las mentas y té verdes. Se podría concluir de estos resultados que las tres modificaciones químicas sucedieron para todos los adsorbentes.



**Figura 4.** Espectros FTIR de la manzanilla nativa y sus modificaciones químicas.

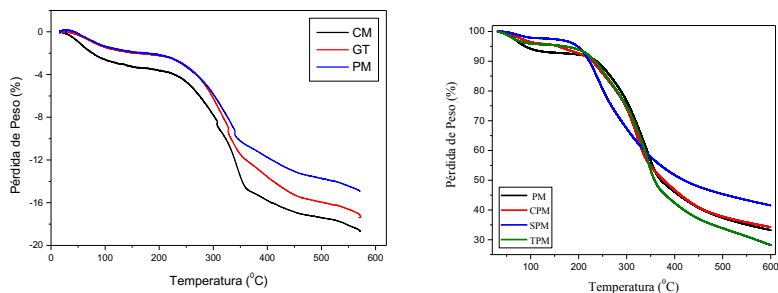
### Microscopia de barrido electrónico

La textura y análisis morfológico de las muestras se estudió mediante microscopia de barrido electrónico. De acuerdo a los resultados (figura 5), se muestran superficies heterogéneas en todos los adsorbentes; evidenciando su potencial uso como adsorbentes. La presencia de poros y rugosidades en la superficie indica que el antibiótico puede quedarse atrapado en esas imperfecciones, facilitando la interacción de grupos funcionales del adsorbente. La figura 5 solo muestra las microscopias de GT y derivados; sin embargo, todas las muestras mostraron resultados muy similares.



**Figura 5.** Microscopias de barrido electrónico (SEM) de las muestras de té verde (superior izquierda), té verde carboxilado (superior derecha), té verde sulfonado (inferior izquierdo) y té verde tiolado (inferior derecho).

Cabe destacar de los resultados de la figura 5 que hay cambios sustanciales y esperando, debido a las modificaciones químicas. Debido al tratamiento ácido en cada una de las reacciones, se observan cambios en la superficie. Si bien las superficies se mantienen heterogéneas, pero hay cierto deterioro de las mismas. Este efecto es más intenso en la tiolación, y la más leve en la carboxilación. Esto puede tener un aspecto favorable en sentido de la continuidad del proyecto. Ya que estos cambios estructurales de las muestras de té, evidencian que la lignina es parcialmente degradada. Esta degradación sería de importante aplicabilidad en materia de producción de bio-combustibles. Estudios científicos aseguran que la producción de bio-combustibles, a partir de materiales lignocelulósicos, está limitado por la presencia de la rígida estructura de lignina. Dado que nuestros adsorbentes modificados muestran cambios estructurales, se podría plantear la hipótesis que la lignina ha sido parcialmente degradada, y podría facilitar la generación de bio-combustibles. Por lo tanto, el beneficio sería doble, las modificaciones químicas incrementan la adsorción de antibióticos en las hojas de té, y además favorecen la producción de bio-combustibles.

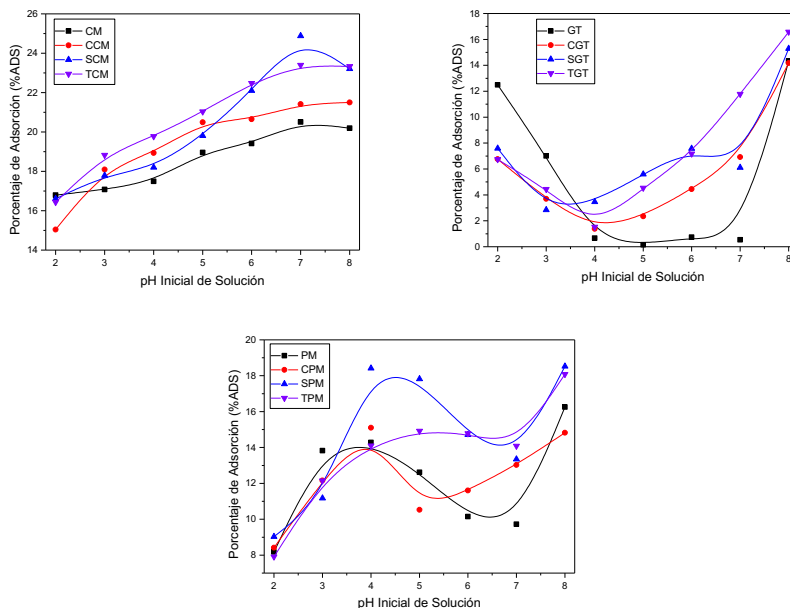


**Figura 6.** Análisis termo-gravimétricos de las muestras de té nativo (izquierda) y de las modificaciones químicas de menta (derecha).

### Análisis termo-gravimétrico

Un adsorbente ideal debe ser capaz de tener resistencia térmica y mecánica para poder resistir situaciones adversas como temperatura y medios agresivos como oxidantes, ácidos y humedad. Esta resistividad puede medirse en función de la estabilidad térmica. Mientras más resistente a la temperatura es un material, más estables y fuertes son las estructuras y polímeros que forman su esqueleto. Bajo esta premisa, se estudió el análisis termo-gravimétrico de todas las muestras. En la figura 6 (izquierda) se muestran los TGA de los té nativos, indicando una mayor estabilidad para GT y PM, comparado con la manzanilla, CM. Este resultado era predecible, dado que CM es en realidad una flor y por lo tanto más frágil en sentido de composición de polímeros estructurales. Se podría concluir que la menor rigidez polimérica de CM propicia una mejor incorporación de los grupos funcionales. GT y PM son más robustos y por lo tanto más difíciles de modificar químicamente. Por otro lado, las modificaciones químicas de la menta, PM se muestran también en la figura 6 (derecha). De los resultados, se concluye que la tiolación y carboxilación tienen efectos en la resistencia de la muestra, pero no muy sustanciales. Al contrario, se podría decir que la carboxilación aumenta, ligeramente, la estabilidad de la muestra. Este resultado podría explicarse dado el estado de oxidación del grupo carboxilo. Este grupo no puede oxidarse más, porque representa el máximo estado de

oxidación de una muestra orgánica, por lo tanto, la acción del calor no tienen un efecto tan fuerte como en muestras que sí pueden oxidarse (nativo, tiolado o sulfonado). En conclusión, la modificación química tiene un efecto mínimo en la resistencia mecánica y térmica de los adsorbentes nativos, indicando que estos materiales aun retienen su integridad estructural. Si bien SEM indica que hay cambios estructurales (de acuerdo a las microscopías), sin embargo los polímeros estructurales de celulosa y hemicelulosa podrían permanecer intactos.



**Figura 7.** Rol del pH inicial de solución en la adsorción de Penicilina G en los adsorbentes nativos y modificados.

### Rol de la acidez en la adsorción de Penicilina G

Luego de la preparación de las muestras de té, estos nuevos materiales se probaron como adsorbentes potenciales del antibiótico Penicilina G, a partir de soluciones acuosas bajo agitación orbital de 250 rpm a temperatura ambiente. La concentración inicial y final se midió mediante espectrofotometría visible. Los resultados preliminares de la adsorción de Penicilina G se muestran en la figura 7 para cada uno de los grupos de adsorbentes. De las gráficas, se demuestra que todas las modificaciones químicas causan un aumento de la adsorción de Penicilina G a las condiciones experimentales trabajadas. Este estudio comparó las muestras nativas con las modificaciones, mostrando una gran variabilidad con el pH inicial de la solución. Sin embargo, la adsorción del antibiótico sigue la tendencia: CMs > PMs ≥ GTs. Aparentemente, los polisacáridos estructurales de la familia de las manzanillas (CMs) muestran una mayor afinidad con Penicilina G. Como se mencionó anteriormente, GT y PM son hojas de planta, mientras que CM es la flor de una planta. Esta característica podría explicar las diferencias en la adsorción. En cuanto a las diferencias entre las modificaciones químicas,

se observa que la sulfonación y tiolación presentan la mayor adsorción para todos los tipos de adsorbentes. Se podría postular que la presencia de azufre y formación de dipolo-dipolo aumenta la afinidad de Penicilina G. Cabe resaltar que de acuerdo a la figura 1, Penicilina G presenta azufre dentro de su estructura, por lo tanto la formación de puentes disulfuro entre el antibiótico y los grupos sulfonilo y tiol, bajo condiciones oxidantes, no puede ser descartada. Sin embargo, se necesitan más experimentos para probar esta hipótesis. Por otro lado, la carboxilación de las muestras no generó cambios sustanciales en la adsorción de Penicilina G. Este fenómeno podría explicarse en base a la formación de puentes de hidrógeno internos entre los grupos carboxilo. En conclusión, las modificaciones químicas siguen la tendencia: Sulfonación  $\geq$  Tiolación > Carboxilación.

La química del antibiótico también mostró efectos de la acidez de la solución. Por ejemplo las muestras CMs tienen un comportamiento lineal de la adsorción a pH crecientes con una máxima adsorción a pH 7, mientras que los GTs muestran adsorciones máximas a pH 2 y 8. Las muestras PMs tienen un comportamiento más heterogéneo en respuesta al pH, con máxima adsorción a valores de 4 y 8. En conclusión, el rol de la acidez en la adsorción de Penicilina G reside primordialmente en la química acuosa de los grupos funcionales y las muestras de adsorbentes, mas no en la química acuosa del antibiótico. Además, la máxima adsorción observada para todos los adsorbentes se ajusta a condiciones reales de aguas residuales, dentro del rango de pH 7-8. En la actualidad se están llevando a cabo más pruebas de adsorción para optimizar la adsorción con los adsorbentes modificados óptimos a diferentes condiciones experimentales de masa de adsorbente, concentración de antibiótico, salinidad, presencia de detergentes, presencia de otros contaminantes y tiempo.

## CONCLUSIONES

El problema de la eliminación de contaminantes emergentes como antibióticos y otros productos farmacéuticos está cobrando auge en el área de la biotecnología. La biosorción ha sido empleada en el tratamiento de aguas residuales en las últimas décadas, focalizándose en la remediación de metales pesados. Sin embargo, la complejidad química de los nuevos contaminantes emergentes requiere nuevas directrices para la optimización de la adsorción. En este proyecto se usaron residuos de hojas de té de manzanilla (CM), té verde (GT) y menta (PM) y sus modificaciones químicas (carboxilación, tiolación y sulfonación) para la remoción de Penicilina G a partir de soluciones acuosas. Se realizaron las modificaciones químicas en medio acuoso, con la minimización de reactivos y la máxima incorporación de nuevos grupos funcionales. Los adsorbentes producidos se caracterizaron mediante espectroscopia infrarrojo, microscopia de barrido electrónico, y termo-gravimetría. Los resultados indican que los adsorbentes modificados incorporaron los nuevos grupos químicos, retienen las propiedades térmicas y morfológicas, adecuadas para biosorbentes. Se observaron cambios en la superficie de los productos tiolados, principalmente. La resistencia térmica indica que la presencia de polisacáridos estructurales de las muestras nativas no fue afectada a consecuencia de la reacción química. Las pruebas de adsorción demuestran que la tiolación y sulfonación fueron las modificaciones químicas más efectivas, sobre todo en

la adsorbente CM, alcanzando %ADS de 27 %, dentro del rango de pH 7-8. La tendencia de máxima adsorción de Penicilina G tiene la secuencia: CMs > PMs ≥ GTs, mientras que las modificaciones químicas siguen la tendencia: Sulfonación ≥ Tiolación > Carboxilación.

## **AGRADECIMIENTO**

Este proyecto fue financiado por INNOVATE-Perú, proyecto 169-PNICP-ECIP-2015 y a C3IRG grant #1224 de la City University of New York. Se agradece a las instalaciones de la Sección Química de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la UPCH por la ayuda brindada durante la ejecución de los experimentos.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Silva J. Biosorción de Penicilina G como Contaminante emergente con adsorbentes naturales y químicamente modificados. [Tesis de Licenciatura]. Lima, Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2016.
2. Mottaleb MA, Meziani MJ, Matin MA, Arafat MM, Wahab MA. ACS Symposium Series. Vol 1198, USA: ACS; 2015, p. 43-74.
3. Center for Disease Dynamics, Economy and Policy. State of the World's Antibiotics. CDDEP. Washington DC; 2015, p. 26-32.
4. Jjemba P. Excretion and Ecotoxicity of Pharmaceutical and Personal Care Products in the Environment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006;63(1):113-130.
5. Ternes T, Joss A. Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances: The Micropollutant Challenge for Urban Water Management. London: IWA Publishing; 2007.
6. Cunningham V, Buzby M, Hutchinson T, Mastrocco F, Parke N, Roden N. Effects of Human Pharmaceuticals on Aquatic Life: Next Steps. *Environ Sci Technol.* 2006; 40(11):3456-3462.
7. Bush K. Antimicrobial Agents. *Curr Opin Chem Biol.* 1997; 1(2): 169-175.
8. Liu Y, Wang J. Fundamentals and Applications of Biosorption Isotherms, Kinetics and Thermodynamics. New York: Nova Science Publishers; 2009.
9. Kotrba P, Machova M, Macek T. Microbial biosorption of metals. New York: Ed. Springer Science; 2011.
10. Choi Y, Isaac P, Irkakhujjev S, Masud ME, Navarro AE. Use of spent tea wastes-chitosan capsules for the removal of divalent copper ions. *J J Environ Sci.* 2015; 1(1): 003.
11. Navarro AE, Musaev H, Serrano K, Masud ME. Adsorption kinetics of cobalt (II) ions onto alginate beads from aqueous solutions. *J Earth Sci Climate Change.* 2014; 5:223. doi: 10.4172/2157-7617.1000223.
12. Park R, Kim G, Shen L, Hong M, Navarro AE. Batch adsorption of heavy metals onto chai tea residues for the bioremediation of contaminated solutions. *Curr Top Biotechnol.* 2014; 8: 51-62.

13. Zarzar A, Hong M, Llanos B, Navarro AE. Insights into the eco-friendly adsorption of caffeine from contaminated solutions by using hydrogel beads. *J Environ Anal Chem* 2:150. doi: 10.4172/2380-2391.1000150.
14. Japhe T, Zhdanova K, Rodenburg L, Roberson L, Navarro AE. Factors affecting the Biosorption of 2-Chlorophenol using spent tea leaf wastes as adsorbents. *J J Environ Sci.* 2015; 1(2): 010.
15. Zahir H, Naidoo M, Kostadinova RM, Ortiz KA, Sun-Kou R, Navarro AE. Decolorization of hair dye by lignocellulosic waste materials from contaminated waters. *Front Environ Toxicol.* 2014, 2:28. doi: 10.3389/fenvs.2014.00028
16. Japhe T, Paulsingh R, Ko K, Hong J, Navarro AE. Bioremoval of antibiotics by using biodegradable hydrogel beads from aqueous solutions. *J J Environ Sci.* 2015; 1(1):002.
17. Liimatainen H, Visanko M, Sirvio J, Hormi O, Niinimäki J. Sulfonated cellulose nanofibrils obtained from wood pulp through regioselective oxidative bisulfite pre-treatment. *Cellulose.* 2013; 20:741-749.
18. Wu Z, Cheng Z, Ma W. Adsorption of Pb(II) from glucose solution on thiol-functionalized cellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 2012; 104: 807-809.
19. Wang S, Wang L, Kong W, Ren J, Liu C, Wang K, Sun R, She D. Preparation, characterization of carboxylated bamboo fibers and their adsorption for lead(II) ions in aqueous solution. *Cellulose.* 2013; 20:2091-2100.



## AISLAMIENTO DEL ÁCIDO LECANÓRICO Y ÁCIDO ÚSNICO DEL LIQUEN *Umbilicaria calvescens* Nyl.

Judith Ramos Chávez<sup>1\*</sup>, Elena A. Cóndor Cuyubamba<sup>2</sup>

### RESUMEN

A partir del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl. se realizó el aislamiento de los compuestos líquénicos mayoritarios: ácido úsnico y ácido lecanórico. El aislamiento de los compuestos líquénicos fue mediante la cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos en acetona y n-hexano del líquen. Cristales amarillos fueron obtenidos del extracto en n-hexano, mientras que un sólido blanco fue obtenido del extracto acetónico. Los cristales obtenidos fueron identificados por sus características físicas y por los espectros UV, IR, EM, <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN.

**Palabras clave:** ácido úsnico, ácido lecanórico, *Umbilicaria calvescens* Nyl., líquenes.

## ISOLATION OF LECANORIC ACID AND USNIC ACID FROM LICHEN *Umbilicaria calvescens* Nyl.

### ABSTRACT

From the lichen *Umbilicaria calvescens* Nyl., was made the isolation of the major lichen compounds: usnic acid and lecanoric acid. Isolation of lichen compounds was performed by column chromatography (CC) and thin layer chromatography (CCF) of the extracts made in acetone and hexane. Yellow crystals were obtained from the n-hexane extract, while a white solid was obtained from the acetone extract. The crystals obtained were identified by their physical characteristics and by the UV, IR, MS, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectra.

**Key words:** usnic acid, lecanoric acid, *Umbilicaria calvescens* Nyl., lichens.

### INTRODUCCIÓN

Los líquenes son seres muy complejos originados por la simbiosis entre un hongo heterótrofo (micobionte) y un alga autótrofa (fotobionte). De esta interacción mutualista se originan los

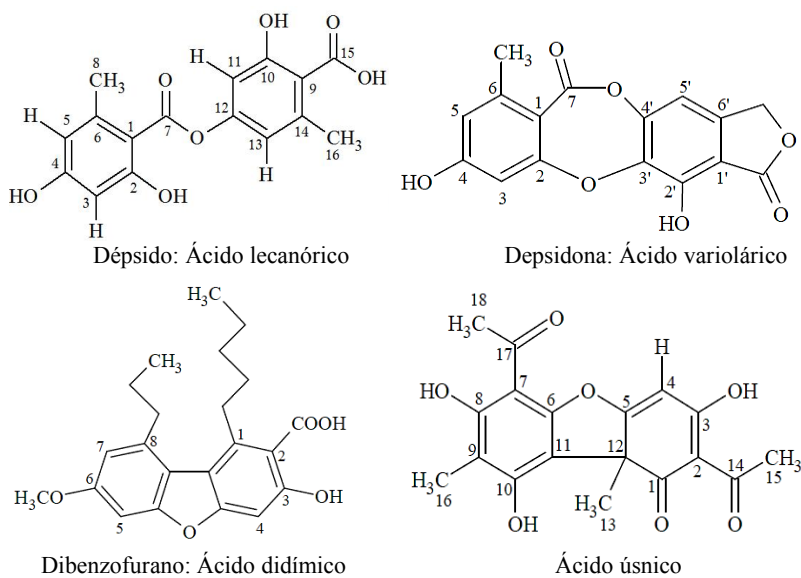
---

<sup>1\*</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210 Rímac, Lima-Perú, judirach@hotmail.com

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias de la UNI.

talos liquénicos con morfología, anatomía, fisiología y ecología específica, presentando de esta forma características únicas de las dos partes<sup>1</sup>.

Teniendo en cuenta la diversidad en ecosistemas presentes en el Perú, la proliferación de distintas especies liquénicas es favorable, sin embargo, los estudios químicos (liquenoquímica), biológicos y fisicoquímicos a nivel de sus extractos y sus metabolitos secundarios son escasos. No obstante, a nivel mundial, estos extractos son usados para tratar algunas enfermedades respiratorias, estomacales y afecciones renales en el campo de la medicina tradicional. Dentro de los metabolitos secundarios que sólo se encuentran en los líquenes, tenemos a los compuestos liquénicos, los cuales presentan actividades antioxidantes, antimicótica, antiinflamatoria, entre otros. Estos se clasifican como dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos<sup>1,2</sup> (figura 1).



**Figura 1.** Compuestos liquénicos.

El líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl. es del tipo folioso y de talo umbilicado monofilo con la cara superior de color crema o marrón dependiendo. La médula del líquen es de un color blanco o rosa carmín, debido a la presencia de minerales, y presenta apotecios negros de tipo girodisco de menos de 2 mm de diámetro. Asimismo, la distribución geográfica para el género *Umbilicaria* es mayormente en las zonas árticas<sup>3</sup>.

El enfoque de este trabajo es el aislamiento e identificación de los compuestos liquénicos mayoritarios en el líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl., siendo este el primer trabajo realizado para esta especie.

## PARTE EXPERIMENTAL

Los equipos e instrumentos utilizados fueron: un equipo de punto de fusión Thermo Fisher Scientific 9100; una lámpara UV MODEL UVGL-58/Spectroline 254-366 nm; un espectrofotómetro IRPrestige-21 SHIMADZU; un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800; un espectrómetro de masas MS ADVION COMPACT y un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Avance 400 MHz.

### Recolección, secado y molienda de la muestra

La especie líquénica fue recolectada en el camino al nevado de Huaytapallana (aprox. entre los km 17 y 18 de la vía Palián), con una altitud entre los 4000 - 4500 msnm, en el distrito y provincia de Huancayo, departamento de Junín. La determinación botánica de la especie líquénica fue realizada por el Blgo. Ángel M. Ramírez Ordaya en los ambientes del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; siendo identificada como la especie líquénica *Umbilicaria calvescens* Nyl.

La especie líquénica (previamente limpiada) se secó en una estufa a 40°C durante 24 horas; luego se pulverizó por medio de una picadora doméstica.

### Aislamiento de los compuestos líquénicos

**Extracción.** 500 g del líquen seco y molido fue macerado en 1,7 litros de n-hexano a temperatura ambiente durante 24 horas; luego, se filtró y se concentró, este procedimiento se repitió dos veces, obteniéndose 840 mg de EBO (rotulado como fracción H). El residuo sólido es nuevamente macerado en 1,8 litros de acetona a temperatura ambiente durante 24 horas; luego, se filtró y se concentró, repitiéndose dos veces la maceración; al final se obtuvo 82,75 g de EBO (rotulado como fracción A).

**Separación por CC.** Se realizó un análisis preliminar por CCF a las fracciones A y H.

**Fracción A.** Se realizaron tres CC usando sílica gel (SIGMA-ALDRICH, tamaño de poro 60 Å, tamaño de partícula 35-75 µm) como fase estacionaria y como eluentes éter de petróleo: acetato de etilo en la relación de: 0:100, 25:75 y 50:50 en la primera, segunda y tercera CC, respectivamente. En la primera CC se trabajó con 500 mg de la fracción A, obteniéndose 5 sub-fracciones (rotulados como G1-G5), los cuales se concentraron. En la segunda CC se empleó la fracción G3 (mayoritario), obteniéndose 7 sub-fracciones (rotulados como S1-S7) los cuales fueron concentrados, siendo la fracción S6 de mayor cantidad por lo que se realizó una tercera CC, en donde se recolectó 4 sub-fracciones (rotulados como T1-T4), los cuales fueron concentrados.

De acuerdo a la CCF y al punto de fusión de las fracciones obtenidas se observó valores similares en las fracciones G4, S5 y T3 por lo que se juntaron y se rotuló como compuesto A. Este compuesto fue recristalizado en acetona: agua (1:1), obteniéndose 206 mg de un precipitado blanco.

**Fracción H.** Se realizaron dos CC. En la primera CC se empleó la fracción H (840 mg) y como eluyentes la mezcla de acetato de etilo: éter de petróleo (mezclas desde 15:85 hasta 100:0), recolectándose 7 sub-fracciones (rotulados como I1-I7). La fracción I3 (340 mg) fue purificado nuevamente por CC en acetato de etilo: éter de petróleo (30:70), obteniéndose 4 sub-fracciones, (rotulados como U1-U4), los cuales fueron concentrados, y se obtuvo en la fracción U3 un sólido amarillo (rotulado como compuesto B). Este compuesto fue recristalizado en etanol, obteniéndose 86 mg de producto (en forma de cristales amarillos). Adicionalmente, la CCF del compuesto B presentó un  $R_f = 0,62$  (sistema etanol: acetona (1:1)), el cual coincidía con el valor del patrón de ácido úsico (98 %, SIGMA-ALDRICH).

La identificación de los compuestos codificados como A y B fue mediante la interpretación de los espectros UV, IR, EM,  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Compuesto A.** Sólido de color blanco, soluble en metanol y acetona, poco soluble en cloroformo; su punto de fusión varía entre  $182^\circ\text{C}$  -  $184^\circ\text{C}$ ; la reactividad frente al  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  da una coloración rojiza (característico en compuestos que presentan dos grupos hidroxilo (posición meta) en uno de sus anillos); y presentó un  $R_f = 0,29$  en el sistema n-hexano: acetato de etilo (80:20) al ser revelado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10 %.

El espectro UV indicó tres bandas de máxima absorción a 213, 270,8 y 304,2 nm. En el espectro IR se identificaron cinco bandas correspondientes al OH a  $3533,6\text{ cm}^{-1}$ , CH a  $2980\text{ cm}^{-1}$ , C=O a  $1658,8\text{ cm}^{-1}$ , C=C a  $1606,7\text{ cm}^{-1}$  y OH (carboxílico) a  $1240,2\text{ cm}^{-1}$ . El espectro de masas obtenido por la técnica APCI en modo negativo, exhibió un ión molecular  $[\text{M-H}]^-$  a 317 m/z, concordante para la fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_7$  (318 uma). En los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$  se identificaron las señales de los diferentes hidrógenos y de los 16 carbonos, los cuales están resumidos en la tabla 1.

**Tabla 1.** Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO) del compuesto A.

Posición	H ( $\delta$ , ppm)	Características de la señal (H)	C ( $\delta$ , ppm)	Características de la señal (C)
1	-	-	108,93	=C-
2	10,49	s, 1H	160,46	cuaternario
3	6,23	d, $J = 2,19$ Hz, 1H	100,99	terciario
4	-	-	161,57	cuaternario
5	6,24	d, $J = 2,19$ Hz, 1H	110,31	terciario
6	-	-	138,49	cuaternario
7	-	-	167,63	-COO-
8	2,36	s, 3H	21,37	-CH <sub>3</sub>
9	-	-	117,70	cuaternario
10	10,31	s, 1H	159,22	cuaternario
11	6,67	d, $J = 2,2$ Hz, 1H	107,67	terciario
12	-	-	152,61	cuaternario
13	6,62	d, $J = 2,2$ Hz, 1H	114,73	terciario
14	-	-	140,01	cuaternario
15	10,01	s, 1H	170,97	-COOH
16	2,37	s, 3H	21,75	-CH <sub>3</sub>

Considerando los datos espectroscópicos obtenidos y su comparación con las referencias bibliográficas, se concluye que el compuesto A es el ácido lecanórico<sup>4</sup>.

**Compuesto B.** Cristales en forma de agujas de color amarillo, soluble en acetona, poco soluble en etanol; su punto de fusión varía entre 204°C - 205°C; y presentó un  $R_f = 0,62$  en el sistema etanol: acetona (1:1) al ser revelado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10 %.

En el espectro UV se tienen dos bandas a 233,7 y 283,8 nm. En el espectro IR se identificaron las bandas correspondientes al OH a 3086,2  $\text{cm}^{-1}$ , CH a 2913,4  $\text{cm}^{-1}$ , C=O a 1691,6  $\text{cm}^{-1}$ , C=C a 1629,8  $\text{cm}^{-1}$  y C-O-C a 1284  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro de masas (técnica APCI en modo negativo) exhibió un ión molecular  $[\text{M-H}]^-$  a 343 m/z (pico base), concordante para la fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$  (344 uma). En los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN se identificaron las señales de los diferentes hidrógenos y de los 18 carbonos, los cuales se resumen en la tabla 2.

**Tabla 2.** Datos espectroscópicos de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto B.

Posición	H (δ , ppm)	Características de la señal (H)	C (δ , ppm)	Características de la señal (C)
1	-	-	198,07	>C=O
2	-	-	179,40	cuaternario
3	18,86	s, 1H	155,22	cuaternario
4	6,00	s, 1H	98,35	terciario
5	-	-	101,55	cuaternario
6	-	-	191,73	cuaternario
7	-	-	109,35	cuaternario
8	13,34	s, 1H	157,52	cuaternario
9	-	-	103,96	cuaternario
10	11,05	s, 1H	163,91	cuaternario
11	-	-	105,25	cuaternario
12	-	-	59,09	cuaternario
13	1,79	s, 3H	27,91	-CH <sub>3</sub>
14	-	-	200,34	>C=O
15	2,69	s, 3H	32,13	-CH <sub>3</sub>
16	2,13	s, 3H	7,55	-CH <sub>3</sub>
17	-	-	201,79	>C=O
18	2,70	s, 3H	31,29	-CH <sub>3</sub>

Considerando los datos espectroscópicos obtenidos y su comparación con los reportados en la bibliografía, se concluye que este compuesto es el ácido úsnico<sup>5,6</sup>.

## CONCLUSIONES

En el estudio químico del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl. se aislaron los compuestos líquénicos mayoritarios del ácido úsnico y ácido lecanórico, los cuales fueron identificados por la interpretación de sus espectros de UV, IR, EM, <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN; siendo este el primer trabajo realizado para esta especie.

## AGRADECIMIENTO

Se agradece al M.Sc. Pedro Baldera Aguayo y al Departamento de Investigación de la Universidad de Columbia por la obtención de los espectros de masas (EM), <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN de los compuestos aislados.

Se agradece a la Unidad de Investigación (UDI) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo de investigación.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cernava T, Berg G, Grube M. High Life Expectancy of Bacteria on Lichens. *Microb Ecol.* 2016; 72(3): 510-513.
2. Fernández C, Gómez MP, Crespo A. Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. *Pharm Biol.* 2016; 54(1): 1-17.
3. Ramos D, Ramirez A, Durand K & Huallpa J. Diversidad de Líquenes en el Anexo de Tuctumpaya, Distrito de Pocsi, Arequipa, Perú. *Arnaldoa.* 2013; 20 (1): 129-154.
4. Martino D. Estudio Químico Martino D. Estudio Químico *Flavopunctelia flaventior* (Stirt.) Hale. [Tesis de Licenciatura]. Lima: Facultad de Ciencias, Escuela Profesional de Química, UNI; 2015.
5. Córdor E. Estudio Químico de los líquenes *Xanthoparmelia tasmanica* y *Xanthomendoza mendozae*. [Tesis de Maestría]. Lima: Facultad de Ciencias, Escuela Profesional de Química, UNI; 2012.
6. Viteri R. Estudio Fitoquímico del extracto etanólico del líquen *Usnea antarctica*, procedente de la Antártida. [Tesis de Maestría]. San Antonio de los Altos, Venezuela: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas; 2015.

## CARACTERIZACIÓN POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DEL O-CARBOXIMETILQUITOSANO OBTENIDO POR DERIVATIZACIÓN DEL QUITOSANO

Susana Cusihuamán Noa<sup>a</sup>, María Elena Talavera Núñez<sup>b</sup>, Carlos Arenas Chávez<sup>c</sup>,  
David G. Pacheco Salazar<sup>d</sup>, Corina Vera Gonzales<sup>b\*</sup>

### RESUMEN

El O-carboximetilquitosano (O-CMQ) fue derivatizado a partir del copolímero quitosano por el método de alquilación directa. Este método implicó la reacción del quitosano con ácido monocloroacético previa alcalinización. El producto derivatizado mostró solubilidad en un rango de pH de 1-13 y a pH=5 exhibió baja solubilidad. El grado de sustitución (GS) fue de 0,92 mol/mol, determinado por titulación conductimétrica. Los resultados de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) permitieron identificar una banda de absorción de intensidad fuerte a  $1585\text{cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento del C=O, lo que indica la presencia de un anión carboxílico ( $-\text{COO}^-$ ), que es característico del O-carboximetilquitosano. Mediante Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y del carbono ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR) se mostró que la sustitución se llevó a cabo en el carbono 3 y 6 del quitosano. El O-CMQ a concentración de 50mg/mL, incrementó la supervivencia celular en un 8 % frente a la toxicidad del Pb (II) a una concentración de 41,44mg/mL.

**Palabras clave:** Quitosano, O-carboximetilquitosano, grado de sustitución, solubilidad.

## CHARACTERIZATION BY SPECTROSCOPIC TECHNIQUES OF O-CARBOXIMETILQUITOSANO OBTAINED BY DERIVATIZATION OF THE CHITOSAN

### ABSTRACT

The O-carboxymethylchitosan (O-CMQ) was derivatized from the chitosan copolymer by the direct alkylation method. This method involved the reaction of the chitosan with monochloroacetic acid after alkalization. The derivatized product showed solubility

---

<sup>a</sup> Escuela Profesional de Química, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

<sup>b\*</sup> Departamento Académico de Química, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.  
Av. Independencia s/n, Arequipa, Perú. Email: cverag@unsa.edu.pe.

<sup>c</sup> Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

<sup>d</sup> Departamento Académico de Física, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.



in a pH range of 1-13 and low solubility at pH = 5. The degree of substitution (GS) was 0,92, determined by conductometric titration. The results of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) allowed us to identify a strong intensity absorption band at  $1585\text{cm}^{-1}$ , corresponding to the stretching of C = O, which indicates the presence of a carboxylic anion (-COO<sup>-</sup>) that is characteristic of O-carboxymethylchitosan (O-CMQ). Using the Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of proton and carbon-13 (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR) showed that the substitution was carried out on carbon 3 and 6 of chitosan. The derivatized O-CMQ at concentration of 50mg / mL, increased cell survival by 8 % compared to the toxicity of Pb (II) at concentration of 41,44 mg/mL.

**Key words:** Chitosan, O-carboxymethylchitosan, degree of substitution, solubility.

## INTRODUCCIÓN

La quitina es el segundo biopolímero natural más abundante después de la celulosa, su estructura química está constituida por monómeros de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosos unidos entre sí por enlaces  $\beta(1,4)$ . El quitosano es un copolímero derivado desacetilado de la quitina, de 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosos y 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosos, encontrándose presente en crustáceos, insectos y hongos. Debido a sus propiedades singulares tales como: no toxicidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad; el quitosano tiene una amplia gama de aplicaciones en diversos campos: industria de los alimentos, cosméticos, farmacéuticos, biomédicos, tratamiento de aguas y agricultura<sup>1</sup>.

Muchas de las aplicaciones del quitosano se ven afectadas por su escasa solubilidad a pH neutro o alcalino, debido a su estructura cristalina muy estable derivada de enlaces de hidrógeno muy fuertes. Los grupos amino del quitosano son protonados cuando el pH es menor a 6,5 por lo que muestra solubilidad en soluciones ácidas.

La limitada solubilidad del quitosano se puede superar por despolimerización parcial y modificaciones químicas de este polímero, generando derivados solubles en agua<sup>2</sup>.

Sun *et al.*<sup>3</sup> realizaron estudios de un nuevo material adsorbente a base de quitosano para mejorar la selectividad de la adsorción de metales pesados, sintetizando una resina de iones Pb (II) adsorbidos en N,O-carboximetilquitosano reticulada con glutaraldehído. Por otro lado, muestran que la capacidad de adsorción depende de la cantidad de agente reticulante, grado de sustitución del carboximetilquitosano, valor del pH de la solución inicial y el tiempo de adsorción. En los experimentos de adsorción demostraron que el CMQ reticulado tiene una alta selectividad de adsorción para los iones Pb (II) en solución que contiene iones metálicos individuales o la coexistencia de tres metales iones de Cu (II), Zn (II) y Pb (II).

En el presente trabajo se sintetizó el O-carboximetilquitosano y se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas como FT-IR, RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Por otro lado, se evaluó el efecto citoprotector del O-CMQ frente a iones plomo.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reactivos

Quitosano (peso molecular medio, grado de desacetilación 84,1 %, viscosidad 525cps), ácido monocloroacético (reactivo ACS,  $\geq 99$  %) obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Hidróxido de sodio (p.a.  $\geq 99$  %), etanol absoluto (p.a.  $\geq 99,8$  %) adquiridos de la empresa Merck Millipore. Agua ultrapura Tipo 2.

### Síntesis de carboximetilquitosano

El O-CMQ fue sintetizado a partir de quitosano usando el método de alquilación directa<sup>4</sup>. Para la síntesis del O-CMQ, fue disuelto el hidróxido de sodio (6,25g) en 17mL de la mezcla agua-isopropanol (1:1). Luego 1g de quitosano fue dispersado dentro de la solución anterior y se mantuvo a 25°C por 8 horas bajo agitación constante para hinchar y alcalinizar la red polimérica, conformando esta la solución alcalinizada.

Por otro lado, en un vaso de precipitado fue disuelto 6g de ácido monocloroacético en 7,5mL de isopropanol y se agregó gota a gota a la solución alcalinizada con agitación constante a 50°C de temperatura, durante 30 minutos. Se continuó el proceso de reacción por 6 horas, al finalizar el tiempo se detuvo la reacción agregando 25 mL de etanol al 70 %; obteniéndose el sólido O-CMQ, el que fue filtrado y lavado con etanol al 90 % para desalar y deshidratar, hasta lograr un pH neutro en los lavados. Finalmente, el O-CMQ fue secado por 12 horas en una estufa a 40 $\pm$ 5°C y conservado en un desecador para las pruebas de caracterización posteriores.

### Caracterización

#### Solubilidad en agua

La solubilidad del quitosano (Q) y del O-CMQ en medio acuoso a diferentes pH fue evaluado mediante la determinación de la turbidez por espectrofotometría UV-visible a una longitud de onda de 450nm, basado en el método descrito por Chen y Park<sup>5</sup>.

Se preparó una solución de quitosano y otra de O-CMQ a una concentración de 1,5g/Ly el pH fue ajustado utilizando ácido clorhídrico (0,5 %) e hidróxido de sodio (0,5 %). Se realizó la lectura en un espectrofotómetro uv-visible Gold-Spectrumlab 54 y cuando la absorbancia fue mayor a 0,070 o menor a 85 % de transmitancia, se consideró insoluble.

#### Análisis conductimétrico

El grado de sustitución (GS) es el número relativo de los grupos carboximetilados en la cadena del quitosano, el cual fue determinado usando el método conductimétrico, como lo indica Vaghani *et al.*<sup>7</sup>. Se preparó una solución disolviendo 0,1g de carboximetilquitosano en HCl 0,05M, posteriormente se ajustó el pH a 2,0-2,2 con NaOH 0,1M. La titulación se llevó a cabo a 25 $\pm$ 0,5°C, agregando 0,5mL de NaOH 0,1M para cada medida conductimétrica, hasta llegar a un pH de 11,5. La curva de valoración se muestra en la figura 1, el GS se calculó usando la siguiente ecuación 1:

$$GS = \frac{(V_2 - V_1)}{(V_3 - V_2)} \times GD \quad (1)$$

Donde GS es el grado de sustitución del O-CMQ (mol/mol del total de monómeros); GD es el grado de desacetilación del quitosano original;  $V_1$  es el volumen de base añadida para alcanzar el primer punto de inflexión;  $V_2$  es el volumen de base añadida para alcanzar el segundo punto de inflexión y  $V_3$  es el volumen de base añadida para alcanzar el tercer punto de inflexión<sup>7</sup>.

### **Peso molecular**

Para obtener el peso molecular del carboximetilquitosano (O-CMQ), se determinó la viscosidad intrínseca del mismo, disolviendo 50 mg del O-CMQ (previamente secada a 45°C por 24h) en 25 ml de agua destilada, luego se mantuvo en agitación constante por 24 horas, seguidamente se añadió 25 ml de solución de NaCl 0,2 mol/ L y se continuó la agitación por 30 minutos más. La solución se filtró en membrana con diámetro de los poros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore - White SCWP).

A partir de esta solución se preparó soluciones a las distintas concentraciones (0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,4 % y 0,6 %) en NaCl 0,1 mol/L.

Se tomó una alícuota de 10mL de cada una de las soluciones y se registró el tiempo de caída en el viscosímetro de vidrio (Ostwald), las medidas se realizaron en baño maría a 30,0 $\pm$ 0,5°C<sup>8</sup>.

### **Espectroscopia FT/IR**

El espectro infrarrojo fue obtenido de un Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier, marca SHIMADZU affinity1 con accesorio de reflectancia total atenuada (ATR). La muestra seca fue colocada en el cristal ATR directamente. El espectro obtenido fue de 750-4000  $\text{cm}^{-1}$  de longitud de onda con 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolución.

### **Resonancia magnética nuclear**

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se empleó para desarrollar la elucidación estructural del copolímero. El espectro de la muestra se obtuvo del espectrómetro Bruker Avance III HD 500 MHz (11,75 T) de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias - Sección Química.

Previo análisis, la muestra fue secada durante 24 horas. Luego, se disolvió 0,0293g de O-CMQ en 0,9mL de  $\text{D}_2\text{O}$  y se añadió 0,1mL de TSP (1,25mg/mL) para la referencia del espectro de  $^1\text{H}$  – RMN.

Evaluación de la actividad biológica del O-CMQ

### **Cultivo celular**

Los linfocitos humanos, fueron separados a partir de sangre total en un gradiente de densidad de Ficoll (polímero de alto peso molecular que permite la separación de las células

mononucleares de los eritrocitos) y se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con suero fetal bovino 10 %, penicilina (100µg/mL), estreptomycin (100µg/mL) y finalmente fueron incubadas en una cámara de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37°C.

Los linfocitos se sembraron a una densidad de 1 x 10<sup>6</sup> células / pocillo en placas de cultivo celular de 24 pocillos y se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar. Después de 24 horas se renovó el medio de cultivo y se evaluó el efecto citoprotector.

### **Efecto citoprotector**

Se evaluó el efecto citoprotector del O-CMQ a una concentración de 0,5 mg/mL, frente a concentraciones de plomo (PbCl<sub>2</sub>) 41,44 y 82,88 mg/mL. Como blanco se utilizó leucocitos sin tratamiento. Pasada las 48 horas de incubación se renovó el medio de cultivo y se realizó el ensayo de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

### **Ensayo MTT**

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, produciéndose un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Para este ensayo, se agregó a cada tratamiento 100µL de MTT. Después de una hora las células son retiradas de la placa de cultivo y se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm. Luego, se disolvió los cristales de formazán en 150 µL de KOH 2M y 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO), se aforó a 500 µL con agua destilada y se midió la absorbancia a 570 nm<sup>9</sup>.

El porcentaje de viabilidad se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Supervivencia celular (\%)} = \frac{A_{570} \text{ de las muestras tratadas}}{A_{570} \text{ de as muestras no tratadas}} \times 100 \quad (2)$$

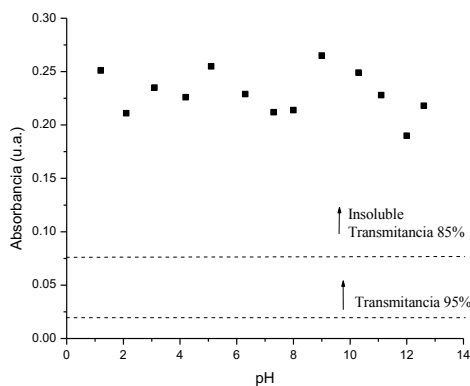
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Solubilidad en agua**

Abreu y Campana-Filho<sup>6</sup>, indican que la solubilidad del polímero O-CMQ está determinada por el equilibrio que implica la protonación de los grupos amino y la disociación de los grupos carboximetilo. Así, las cargas negativas predominarán si el medio es moderadamente alcalino, mientras que las cargas positivas serán predominantes en medio ácido. Aparentemente, el principal factor para determinar la solubilidad del polímero a un pH dado es el exceso de cargas positivas o negativas, la insolubilidad del polímero es resultado de insuficiente carga. De igual manera, la solubilidad se encuentra estrechamente relacionada

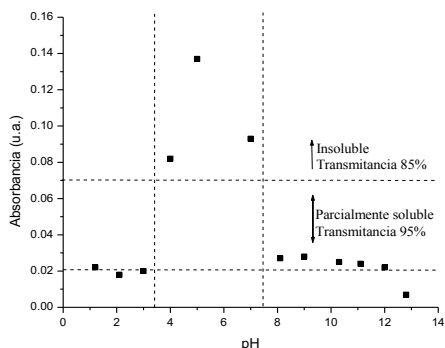
con el grado de sustitución que presenta el O-CMQ, como lo indica Hjerde<sup>10</sup>, quien reportó que el carboximetilquitosano con un grado de sustitución mayor a 60 % puede disolverse en soluciones acuosas ácidas, neutras y alcalinas.

En la figura 1 se puede observar que el quitosano es totalmente insoluble a los diferentes pH evaluados. Según Abreu y Campana-Filho<sup>6</sup>, la insolubilidad del quitosano, en medio ácido, se debe a que no habría la suficiente cantidad de ácido en el medio para protonar sus grupos aminos y su insolubilidad en el medio alcalino fue debido a que no presenta carga a pH mayor a 7,2.



**Figura 1.** Evaluación de la solubilidad del quitosano (Q) a distintos pH, a 450 nm de longitud de onda.

En la figura 2, el O-CMQ presenta un rango mayor de solubilidad, excepto a pH 5 y los pH 4, 6 y 7 pueden ser considerados parcialmente solubles por estar muy cercano al 85 % de transmitancia. Además, se puede observar que existe una buena solubilidad para los pHs comprendidos entre 1-3 debido a la protonación de los grupos amino y a los pHs 12-13 por la protonación de los grupos carboximetilos.



**Figura 2.** Evaluación de la solubilidad del O-CMQ a distintos pH a 450 nm de longitud de onda.

La solubilidad presentada por el O-CMQ se puede atribuir a la presencia de los grupos carboximetilos que contribuyeron a impartir un carácter polielectrolítico aniónico y a la disociación de los grupos amino que le imparten un carácter polielectrolítico catiónico<sup>6</sup>.

### Análisis conductimétrico

La titulación de O-CMQ presenta características complejas debido a la presencia de grupos carboxílico con constantes de acidez similares. La curva de titulación conductimétrica del O-CMQ está curvada en el rango de 9,00 a 19,50 mL de NaOH, a la cual se le ha ajustado cuatro ramas lineales con tres intersecciones, las que llamaremos  $V_1$ ,  $V_2$  y  $V_3$  (figura 3). El primer punto de intersección  $V_1$  (primera rama) corresponde al volumen de base añadido para la neutralización del ácido clorhídrico en exceso, la diferencia de  $V_2 - V_1$  (segunda rama) corresponde al volumen de la base necesaria para neutralizar los grupos carboximetilo ( $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ) y la diferencia de  $V_3 - V_2$  (tercera rama) es el volumen de base necesaria para neutralizar los grupos de amonio ( $-\text{NH}_3^+$ ) el cual es proporcional al grado de desacetilación del quitosano original. La cuarta rama lineal de la curva indica el exceso de NaOH. Se utilizaron los valores de los volúmenes equivalentes a la segunda rama ( $V_2 - V_1$ ) y tercera rama ( $V_3 - V_2$ ) obtenidos de las curvas de valoración, para calcular el grado de sustitución (GS) utilizando la ecuación 1. El GS obtenido fue 0,92 (mol/mol) para el O-CMQ preparado. Campana-Filho<sup>11</sup> indica que los grados de sustitución altos se deben, fundamentalmente, al exceso de ácido monocloroacético y no a tiempos de reacción prolongados.

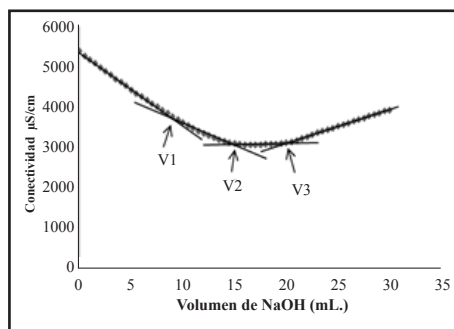


Figura 3. Curva de titulación del O-Carboximetilquitosano.

### Masa molecular viscosimétrica (MV)

La masa molecular viscosimétrica es uno de los parámetros más importantes a tomar en cuenta, ya que con esto se puede determinar la solubilidad y sus posibles aplicaciones.

La viscosidad puede ser descrita en función a la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  del polielectrolito y de su concentración, siempre que haya una fuerza iónica suficientemente elevada y no exista interacciones macromoleculares (sistema diluido). En este caso, se puede aplicar la relación de Huggins (ecuación 3)<sup>12</sup>.

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H \times [\eta]^2 \times C \quad (3)$$

La viscosidad intrínseca del O-CMQ se determinó a partir de la extrapolación de la viscosidad reducida  $[\eta_{sp}/C]$  en función a la concentración a dilución infinita, y la masa molar viscosimétrica promedio ( $\overline{M}_v$ ) se calculó de acuerdo con la ecuación de Mark-Houwink (ecuación 2).

$$[\eta] = K \cdot \overline{M}_v^\alpha \tag{4}$$

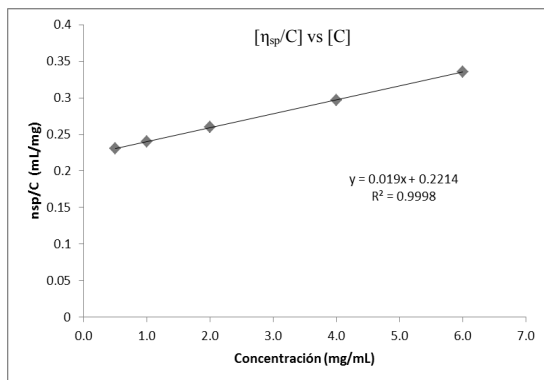
Donde:

“Los valores de los parámetros K' y  $\alpha$  utilizados fueron los siguientes:  $K' = 7,92 \times 10^{-5}$ ,  $\alpha = 1,00$ ”<sup>8</sup>.

En la figura 4 se observa la curva de viscosidad reducida del O-CMQ, en función de la concentración. Los puntos experimentales presentan una correlación lineal elevada ( $R^2 = 0,9998$ ), mostrando que las condiciones experimentales empleadas para la determinación de la viscosidad específica fueron adecuadas. Con las ecuaciones 3 y 4 se obtiene la viscosidad intrínseca  $[\eta] = 221,4 \text{ mL/g}$  y y la masa viscosimétrica promedio es de  $27,95 \text{ g/mol}$ .

El bajo valor de masa viscosimétrica media se debe al comportamiento viscosimétrico de polielectrólitos, tal como el O-CMQ, se espera que en solución los grupos  $\text{CH}_2\text{COO-Na}^+$  se disocien, generando cargas en las cadenas e interacciones de larga distancia, del tipo electrostáticas. En este caso, los contra-iones se distancian y las cargas localizadas en el macro-ion provocan la expansión de la cadena polimérica, resultando el aumento de la viscosidad<sup>13</sup>.

A pesar de las interacciones entre cadenas, las uniones de hidrógenos y la repulsión electrostática contribuyen a aumentar el peso molecular viscosimétrico medio, pero prevalece la despolimerización de la cadena del polímero causada por el álcali presente en el medio de reacción en la que se preparan las muestras de O-CMC. Por lo tanto, los valores de masa molar media viscosimétrica y viscosidad intrínseca son menores en las muestra de O-CMQ<sup>13</sup>.



**Figura 4.** Curva de viscosidad reducida en función de la concentración del O-CMQ en solución de NaCl 0,1 mol/L a 30°C de temperatura.

### Análisis FT/IR del quitosano y O-CMQ

El espectro FTIR del quitosano (figura 5) muestra bandas de absorción entre 3286,8 y 3356,3  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes al estiramiento O-H<sup>5</sup>. Por otro lado, estos mismos picos corresponden a un estiramiento N-H característico de una amina secundaria.

En la región comprendida entre 2874,1 a 2920,4  $\text{cm}^{-1}$  se aprecia dos bandas de absorción moderada correspondientes a las vibraciones de tensión (C-H) propias de grupos  $-\text{CH}_2-$ . Asimismo, en el pico 1647,3  $\text{cm}^{-1}$  muestra una banda de absorción de intensidad moderada correspondiente al estiramiento del C=O propio de una amida primaria.

El espectro del O-CMQ (figura 6) muestra: un pico ancho entre 3400 y 3200  $\text{cm}^{-1}$  causado por las vibraciones de los estiramientos O-H y N-H, en la zona de 2895,2 a 2920,4 se aprecia una banda de absorción correspondiente al estiramiento C-H propia del grupo  $-\text{CH}_3$ . Asimismo, se muestra un pico fuerte a 1415,8  $\text{cm}^{-1}$  el cual es asignado al estiramiento simétrico de la vibración del grupo  $-\text{COO}-$ .

En la figura 6 también se observa un pico de absorción a 1585,5  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del C=O, lo que indica la presencia de un anión carboxílico ( $-\text{COO}-$ ) característico del grupo  $-\text{COONa}^5$ , por el tratamiento con el NaOH utilizados durante la alcalinización del quitosano. El estiramiento  $-\text{C}-\text{O}-$  se encuentra entre 1080 y 1154. Por lo tanto, el resultado indica la sustitución del grupo hidroxilo del quitosano, verificándose la formación del O-CMQ.

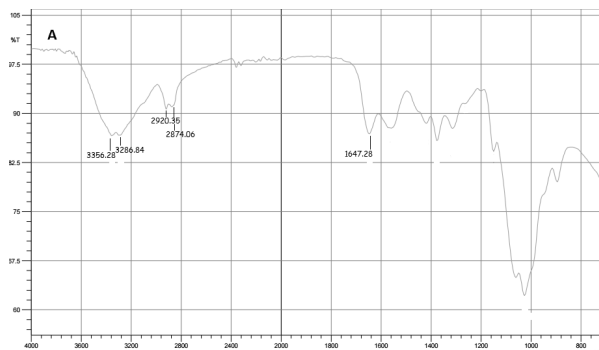


Figura 5. Espectro FTIR de quitosano.



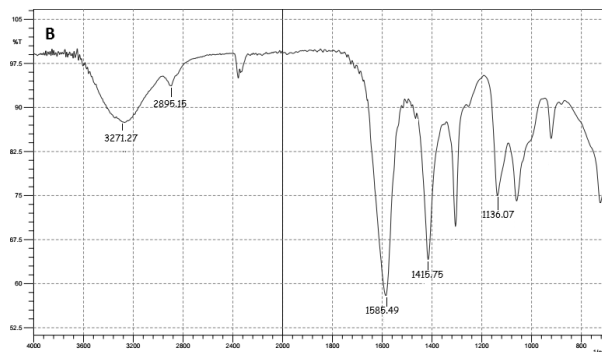


Figura 6. Espectro FTIR del O-CMQ.

### Análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) del O-CMQ

En la figura 7 (A), se presentan el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del O-CMQ. Las señales de protones del O-CMQ aparecieron a 4,49 ppm que corresponde al protón del H3 y a 4,09 ppm correspondiente al protón del H6, cuando está sustituido con el grupo carboximetil.

La figura 7 (B) muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del O-CMQ, observándose señales a 70,26 ppm y 69,5 ppm, que son asignadas al grupo  $-\text{CH}_3\text{COO}-$  sustituidos en los carbonos 6 (C-6) y 3 (C-3), lo que indica alto grado de carboximetilación.

El sustituyente N-carboximetil no se encuentra presente debido a la ausencia de picos a 47 y 168 ppm correspondiente a  $\text{N-CH}_2$  y  $-\text{COOH}$ , respectivamente.

El alto grado de sustitución en el C-6 y en el C-3, se encuentra en concordancia con el resultado del análisis conductimétrico (0,92mol/mol). Chen y Park<sup>5</sup> reportan que altas sustituciones con grupos carboximetilos provoca un rango de insolubilidad a pHs bajos debido a la aplicación de altas temperaturas durante la síntesis del O-CMQ.

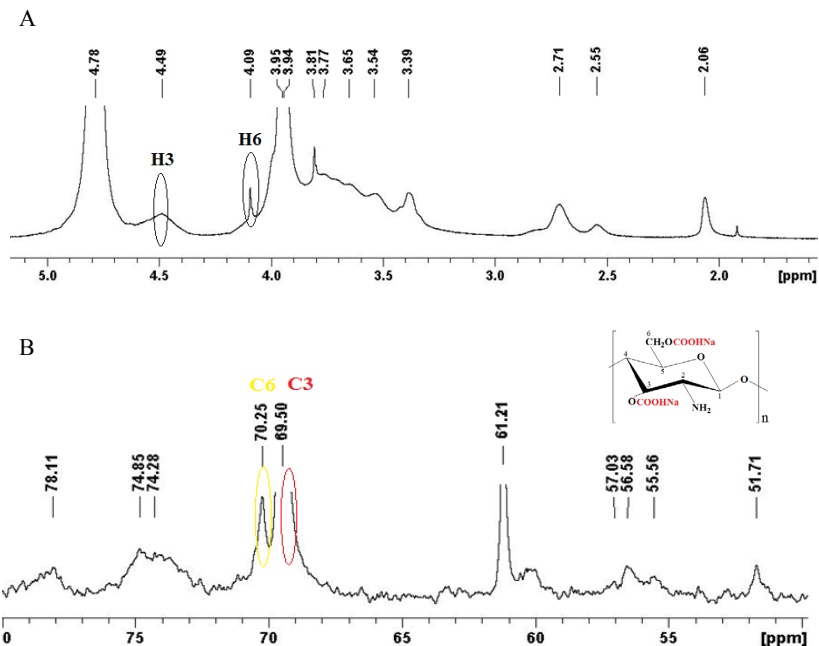


Figura 7 (A). <sup>1</sup>H RMN, (B) <sup>13</sup>C RMN del O-CMQ

### Efecto citoprotector

El efecto citoprotector se determinó mediante la prueba colorimétrica con el bromuro de 3-(4,5- dimetil-tiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), basada en la capacidad selectiva de la supervivencia celular para reducir el componente tetrazolio de MTT en formazán, que son cristales color púrpura.

Tabla 1. Porcentaje de supervivencia celular del O-CMQ expuestas a concentración de 20uM de Pb

Muestras	% Supervivencia celular
Blanco	100,00
O-CMQ 0,5mg/mL	71,53
Pb 41,44mg/mL	55,56
Pb 41,44mg/mL /CMQ 0,5mg/mL	63,89
Pb 82,88 mg/mL	53,47
Pb 82,88 mg/mL /CMQ 0,5mg/mL	53,82

En la tabla 1 se muestra los resultados de la supervivencia celular, expuestos a concentraciones de 41,44 y 82,88 mg/mL de plomo. El O-CMQ atenúa la toxicidad del Pb en un 8,33 % a una concentración de 41,44mg/ML, en cambio para una concentración de plomo de 82,88 mg/mL no hay protección. El efecto de atenuación que presenta el O-CMQ estaría relacionado directamente con el grado de sustitución del O-CMQ, mediante un mecanismo de quelación a través de átomos de oxígeno y nitrógeno coordinados con los iones Pb (II) en la cadena del polímero del O-CMQ<sup>3</sup>.

## CONCLUSIONES

Se preparó O-Carboximetilquitosano (O-CMQ) por reacción de quitosano pre-alcalinizado con ácido monocloroacético, las condiciones de reacción fueron las siguientes: tiempo de alcalinización, 8h; proporción ácido monocloroacético y quitosano, 6:1; temperatura de reacción, 50°C; tiempo de reacción, 6h y agitación constante de 2000 rpm. El O-CMQ obtenido fue soluble en un amplio rango de pH comprendido entre 1-13, con excepción pH 5. El grado de sustitución del O-CMQ fue de 0,92 mol/mol del total de monómeros.

El FT-IR, confirmó la formación del O-CMQ, por la presencia de un pico de absorción a 1585,5 cm<sup>-1</sup> correspondiente al estiramiento del C=O, lo que indica la presencia de un anión carboxílico (-COO-). Por RMN de 1H y 13C se confirmó la formación del O-CMQ, observándose que la sustitución de los grupos carboximetilos ocurrió en los hidroxilos que están presentes en el carbono 3 y 6. Se demostró que el O-CMQ, a una concentración de 50mg/mL, incrementó la supervivencia de las células en un 8,33 % frente a la toxicidad del Pb (II) a una concentración de 41 mg/l.

## AGRADECIMIENTO

Se agradece al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad, Innóvate Perú, por los fondos RNR asignados al proyecto: "Funcionalización de textiles de algodón con nanocompositos NPsAg-carboximetilquitosano para mejorar las propiedades antibacterianas y antifúngicas con potencial aplicación en la fabricación de prendas de uso hospitalario" CONVENIO 396-PNICP-PIAP-2014.

De igual manera se agradece a la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa porque permitió el desarrollo de la investigación en el Laboratorio del Departamento de Química.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006; 31:603–632.
2. Cravotto G, Tagliapietra S, Robaldo B, Trotta M. Chemical modification of chitosan under high-intensity ultrasound. *Ultrason Sonochem.* 2005; 12:95–98.
3. Sun S, Wang L, Wang A. Adsorption properties of crosslinked carboxymethyl-chitosan resin with Pb(II) as template ions. *J Hazard Mat.* 2006; 136(3): 930–937.
4. Mourya VK, Inamdar NN, Tiwari Ashutosh. Carboxymethyl chitosan and its applications. *Adv Mater Lett.* 2010; 1(1):11-33.
5. Chen X-G, Park H-J. Chemical characteristic of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation condition. *Carbohydr Polym.* 2003; 53:355-359.
6. Abreu FR, Campana-Filho SP. Characteristics and properties of carboxymethylchitosan. *Carbohydr Polym.* 2009; 75:214-221.
7. Vaghani SS, Patel MM, Satish CS. Synthesis and characterization of pH-sensitive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan for colon targeted delivery of ornidazole. *Carbohydr Res.* 2012; 347:76-82.
8. Ge H-C, Luo D-K. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. *Carbohydr Res.* 2005; 340:1351–1356.
9. Anitha A, Divya RVV, Krishna R, Sreeja V, Selvamurugan N, Nair SV, et al. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-Carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym.* 2009; 78:672-677.
10. Hjerde RJN, Vårum KM, Grasdalen H, Tokura S, Smidsrød O. Chemical composition of O-(carboxymethyl)- chitins in relation to lysozyme degradation rates. *Carbohydr Polym.* 1997; 34:131-139.
11. Campana-Filho SP, Abreu FR. Preparation and characterization of Carboxymethylchitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 2005; 5(2):79-83.
12. Roberts GAF. Chitin chemistry. London: Mc Millan; 1992. p. 350.
13. De Souza e Silva Daniella. Estudos físico-químicos de O-carboximetilação de quitosana [tesis]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2011.

## OPTIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ACEITE DE SEMILLAS DE *Vitis vinifera* CON CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO

Maritza Barriga-Sánchez<sup>a,b</sup>, Anna Churata Huanca<sup>b</sup>, Óscar Tinoco Gómez<sup>a</sup>

### RESUMEN

Se optimizó el rendimiento de la extracción de aceite de la semilla de uva, variedad Quebranta, con el método superficie respuesta (MSR), se consideraron tres factores: presión (Pbar), temperatura (T) y flujo de CO<sub>2</sub> (F), las variables respuesta fueron el rendimiento de aceite, el valor peróxido (POV) y anisidina. Se caracterizó la semilla y estableció el tamaño de partícula de la semilla para la extracción de aceite. Se realizaron las extracciones según el diseño MSR y se calcularon los rendimientos de aceite, POV y anisidina. Se determinó la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases y la actividad antioxidante por reducción del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) del aceite optimizado obtenido con CO<sub>2</sub> y del extraído con hexano (testigo). La Pbar, T y F ejercieron efecto significativo sobre el rendimiento, pero no ejercieron efecto sobre el POV y anisidina. Los resultados son prometedores para añadir valor agregado a la semilla, residuo de la elaboración de pisco ya que el aceite contenía 66,45 % de ácido linoléico; 20,05 % de ácido oleico y una capacidad antioxidante de 7,80 mM equivalente a Trolox.

**Palabras clave:** CO<sub>2</sub> supercrítico, pisco, semilla de uva, aceite.

## OPTIMIZATION OF SEED OIL EXTRACTION YIELD FROM VITIS VINIFERA WITH SUPERCRITICAL CO<sub>2</sub>

### ABSTRACT

The extraction yield of Quebranta grape seed oil was optimized with the response surface method. Three factors were considered: pressure (Pbar), temperature (T) and CO<sub>2</sub> flow (F). The response variables were the oil yield, peroxide value (POV) and anisidine. The seed was characterized, and the particle size was established for the oil extraction. The extractions were executed according to the RSM design and the oil yield, POV and anisidine were calculated. The composition of fatty acids was determined by gas chromatography and the antioxidant activity by reduction of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydro-radical (DPPH) of

---

<sup>a</sup> Doctorado de Ciencias Ambientales, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Universitaria /Calle Germán Amézaga 375, Lima 1, Perú, mbarriga@itp.gob.pe

<sup>b</sup> Dirección de Investigación, Desarrollo, Innovación y Transferencia Tecnológica, Instituto Tecnológico de la Producción

the optimized oil obtained with CO<sub>2</sub> and that extracted with hexane (control). The Pbar, T and F had significant effect on the oil yield, but did not have significant effect on the POV and anisidine. These results were promising to increase added value of the seed and pisco production residue because the oil contained 66.4 % of linoleic acid, 20.05 % of oleic acid and a Trolox equivalent antioxidant capacity of 7.8 mM.

**Key words:** Supercritical CO<sub>2</sub>, pisco, grape seed, oil.

## INTRODUCCIÓN

El pisco es el aguardiente obtenido exclusivamente por destilación de mostos frescos de “uvas pisqueras” recientemente fermentados, de las zonas de producción reconocidas en el Perú (Norma Técnica Peruana), es una bebida tradicional del Perú.

Los reportes del Instituto Nacional de Estadística muestran producciones de pisco de 2827,8; 3434,5 y 3764,8 miles de litros durante el 2013, 2014 y 2015, respectivamente, generándose grandes cantidades de residuo, conocido como orujo, el cual contiene piel, hollejo y semilla de uva. En Ica lo acumulan fuera de las instalaciones de la planta procesadora de pisco o lo destinan para compostaje, o lo queman causando contaminación ambiental. Considerándose que se requiere de 6 a 7 kg de uva para producir un litro de pisco<sup>1</sup> y que el 6 % de la uva corresponde a las semillas, se estima que en el 2015 no se aprovecharon 1581,2 toneladas de semillas, de las que se hubiera extraído aproximadamente 158 t de aceite. El aceite de semilla de uva contiene 70 % de ácido linoléico y 15 % de ácido oleico<sup>2</sup>. El ácido linoléico es un ácido graso esencial, no puede ser sintetizado por los humanos, tiene efectos favorables en colesterol sérico total, tensión arterial procesos inflamatorios y se recomienda su consumo ya que la sustitución de los ácidos grasos saturados por ácidos grasos polinsaturados disminuye el riesgo de enfermedades coronarias<sup>3</sup>.

Además, los compuestos fenólicos de las uvas poseen actividad antioxidante y antimicrobiana y juegan un rol en la prevención de enfermedades cardiovasculares, incluso del cáncer, previene la peroxidación en lípidos del cerebro, del hígado y daños en el DNA en animales<sup>4</sup>. La extracción con CO<sub>2</sub> y alcohol de orujo de uva de la variedad uvina, residuo de pisco contiene 23 ± 0,2 g equivalente de ácido gálico/kg de extracto<sup>5</sup>. Por otro lado, hay una tendencia para mejorar procesos químicos en armonía con el ambiente, como la técnica de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. Su potencia solvente depende esencialmente de la naturaleza del soluto, de la presión y temperatura del sistema<sup>2</sup>; resultando interesante el estudio de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico del aceite de semilla de uva variedad Quebranta de Ica, residuo de la elaboración de pisco, aun no existen estudios con esta tecnología de extracción en el Perú.

El objetivo del estudio fue optimizar el rendimiento de la extracción de aceite de la semilla de uva con CO<sub>2</sub> supercrítico y determinar la calidad (POV y anisina) del aceite de cada una de las extracciones. Al aceite extraído con las condiciones óptimas y un aceite extraído con hexano se les determinaron el perfil de ácidos grasos, capacidad antioxidante y otros análisis para evaluar la calidad de aceite.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales y métodos

Se colectaron 60 kg de orujo (semillas, hollejo y piel) de uva (*Vitis vinifera*) variedad Quebranta donado por la bodega procesadora de “pisco” Yanquiza, Subtanjalla, Ica (Latitud 14° 1'17.82"S. Longitud 75° 44'35.43"O), se mantuvo la cadena de frío hasta su llegada a Lima al laboratorio de fisicoquímica del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), donde el orujo fue colocado en las bandejas del secador de aire frío (Asahi, Ohiya Nishi-Ku, Japón) a 25 °C durante 36 horas hasta 13 % de humedad, el hollejo y piel de uva fueron separados con el tamiz de acero inoxidable (KM Testing sieve, Japón) de 7 mm de abertura. Las semillas fueron sometidas a secado a 40 °C por 6 horas en una estufa de convección forzada (Venticell, USA) hasta una humedad menor a 7 %. Finalmente, las semillas fueron envasadas al vacío en bolsas de polietileno y guardadas en refrigeración (5 ± 1 °C) hasta su posterior uso.

Los contenidos de proteínas (factor 6,25), humedad, grasa (éter dietílico) y cenizas de la semilla de uva, fueron determinados por duplicado según los métodos establecidos por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC).

### Tamaño de partícula de la semilla de uva en la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico

Con la finalidad de mejorar el rendimiento, se trituro la semilla con un molino (Ika A11, USA), se separaron dos grupos, el primero que pasó el tamiz de 1 mm (Retsch, Alemania) y se quedó retenido en el tamiz de 0,85 mm y el segundo grupo pasó el tamiz de 0,71 mm (Mesh 25). Se realizaron extracciones de aceite por triplicado de cada grupo a 300 bar, 45 °C y flujo de 70 g/min, (condiciones recomendadas por el fabricante del equipo), durante 2 horas. Se determinó el rendimiento (R) usando la ecuación 1

$$R = \frac{m_{\text{aceite}}}{m_{\text{ss}}} \times 100 \dots (1)$$

Donde:

R= % en g de aceite/100 g semilla seca

$m_{\text{aceite}}$  = Peso del aceite (g).

$m_{\text{ss}}$  =Peso de la semilla seca molida sometida a extracción.

### Análisis estadísticos

Se usó el software estadístico Minitab® (versión 17, USA).

Se compararon las medias de los grupos de semillas con la prueba T de student y nivel de confianza de 95 %.

La optimización del rendimiento de aceite con CO<sub>2</sub> supercrítico fue realizado con metodología superficie respuesta (MSR) se consideraron tres factores: presión, temperatura y flujo, los niveles superiores e inferiores de los factores (tabla 1) fueron establecidos según resultados de las pruebas preliminares, los parámetros supercríticos del CO<sub>2</sub> y el funcionamiento del extractor supercrítico.

En el diseño compuesto central (DCC) cada factor tenía 5 niveles (tabla 1) y 3 réplicas en el punto central, con un total de 17 experimentos.

**Tabla 1.** Niveles de los factores del diseño compuesto central.

Variable	Niveles				
	$-\alpha=-1,68$	-1	0	1	$\alpha=1,68$
Presión (P) bar	142,7	170	210	250	277,3
Temperatura (T)°C	33,2	40	50	60	66,8
Flujo (F) g/min	23,2	30	40	50	56,8

### Extracción del aceite

Con CO<sub>2</sub> supercrítico: en el vaso de extracción de 29 mm de diámetro y 147 mm de longitud, se añadió 35 ± 1 g de semilla seca y molida (m<sub>ss</sub>), previamente pasada por el tamiz de mesh 25. El vaso fue colocado en el reactor del equipo extractor multisolvente 2802.0000 (Top industrie, Francia). En el software se programó la temperatura del pre-calentador, reactor y separadores y el flujo del CO<sub>2</sub>, para llegar a la presión se usó una válvula en forma manual. Luego de llegar a las condiciones de temperatura y flujo y presión del diseño DCC (área sombreada de la tabla 2), se inició la extracción durante dos horas. Se determinó R según la ecuación 1.

Con hexano: se pesaron 5 a 6 g de semilla seca y molida y en un dedal fueron colocados en la cámara del sistema soxhlet, con 120 ml de hexano (99,5 % v/v, JT.Baker, México). La extracción duró seis horas. Se determinó R según la ecuación 1.

### Determinaciones analíticas

Los ácidos grasos metilados del aceite optimizado y al extraído con hexano fueron cuantificados con el software del cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Autosystem XL, USA) con detector tipo FID, columna Supelcowax-10 (Merck, Alemania) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de película. Las condiciones de análisis fueron: horno: 160-230 °C, inyector: 250 °C; detector: 270 °C; la presión del hidrógeno 5 psi; split 100:1; volumen de inyección 2 µl. La identificación de los ácidos grasos se realizó con esteres metílicos de ácidos grasos FAME's (Restek, Bellafonte. USA). Se reportaron los resultados como gramos de ácido graso/100 g de aceite.

El valor peróxido (POV), ácidos grasos libres y el índice de yodo fueron determinados según la AOAC y el valor de anisidina según la norma técnica peruana con el espectrómetro UV visible Perkin Elmer (Lambda 950, USA).

La capacidad antioxidante se realizó por reducción del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Alfa Aesar, España), se realizaron las lecturas a 515 nm con el espectrómetro UV visible Perkin Elmer (Lambda 950, USA), se expresó en mM equivalente trolox.

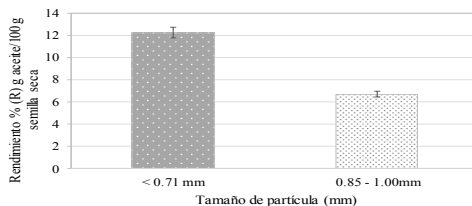


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas de uva variedad quebranta contenían  $6,49 \pm 0,09\%$  de agua,  $12,47 \pm 0,32\%$  de grasa cruda (extracción con éter dietílico). Los valores de grasa fueron superiores a los encontrados por Özcan *et al.*<sup>6</sup> y similares a los encontrados por otros autores<sup>7</sup>.

### Tamaño de partícula en la extracción supercrítica

Los contenidos de aceite extraídos con CO<sub>2</sub> supercrítico de la semilla de 0,85-1mm eran inferiores que el contenido de grasa cruda, los bajos rendimientos se deben a que el aceite quedó retenido en el interior de las partículas. Se obtuvieron mayores rendimientos de aceite con tamaños de partículas  $< 0,71$  mm (Fig. 1), debido a que existe mayor superficie de contacto con CO<sub>2</sub> supercrítico facilitando la mayor solubilización y extracción del aceite de la semilla. Este resultado coincide con Fiori *et al.*<sup>8</sup>, quienes obtuvieron mayores rendimientos con partículas de 0,39 a 0,5 mm.



**Figura 1.** Rendimiento de aceite con CO<sub>2</sub> supercrítico de las semillas de uva con diferentes tamaños de partícula.

### Análisis del DCC de optimización de la extracción de aceite con CO<sub>2</sub> supercrítico

La presión (Pbar), temperatura (T), flujo (F) y la interacción entre ellos ejercieron un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) sobre el rendimiento de aceite (tabla 2). El coeficiente de determinación del modelo fue de 96,73 %, indicando que el modelo predictivo fue altamente significativo. El análisis de regresión de superficie respuesta reporta el modelo predictivo de optimización

$$R = -23,4 + 0,1973 P - 0,614 T + 1,134 F + 0,000444 P^2 + 0,003559 P \times T - 0,002690 P \times F - 0,00838 T \times F$$

Por otro lado, la presión, temperatura, flujo no presentaron un efecto significativo sobre los valores de POV y anisidina del aceite extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico (valores de ANOVA no mostrados ( $P > 0,05$ )).

**Tabla 2.** Diseño compuesto central (DCC) y variables respuesta.

Experimentos	Variable independiente			Variable dependiente		
	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo (g/min)	R g aceite/100g	POV mequivO <sub>2</sub> /kg	Anisidina
1	170	40	30	7,18	0,77	5,32
2	250	40	30	13,75	2,06	3,17
3	170	60	30	2,37	1,88	4,46
4	250	60	30	12,95	1,27	4,34
5	170	40	50	14,19	1,12	4,20
6	250	40	50	14,77	0,48	3,05
7	170	60	50	4,34	0,71	4,32
8	250	60	50	12,30	0,18	3,30
9	142,7	50	40	3,69	0,54	3,70
10	277,3	50	40	14,76	0,68	3,30
11	210	33,2	40	13,20	2,30	2,94
12	210	66,8	40	7,49	2,30	3,20
13	210	50	23,2	7,37	1,19	4,01
14	210	50	56,8	13,95	1,90	2,34
15	210	50	40	11,70	2,34	2,16
16	210	50	40	12,37	1,34	2,31
17	210	50	40	12,01	1,70	2,25

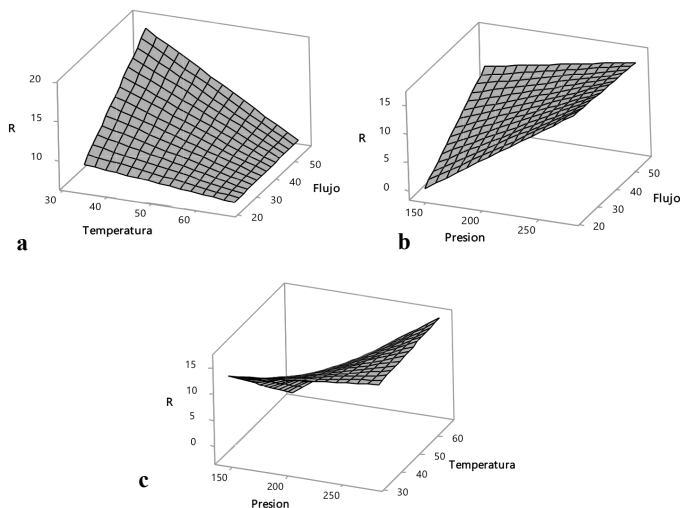
Aizpurua *et al.*<sup>9</sup> mencionaron que la temperatura y tiempo no ejercieron efecto en el rendimiento de aceite en semilla de uva pero que el flujo y presión sí fueron significativos, caso contrario se demostró en este trabajo la temperatura sí ejerció efecto sobre el rendimiento de aceite, sin embargo, la temperatura óptima de Aizpurua *et al.*<sup>9</sup> fue muy cercana a la que se encontró en este trabajo.

**Tabla 3.** ANOVA de la regresión de superficie respuesta P, T y F versus el rendimiento (R) (g aceite/100 g de semilla de uva deshidratada).

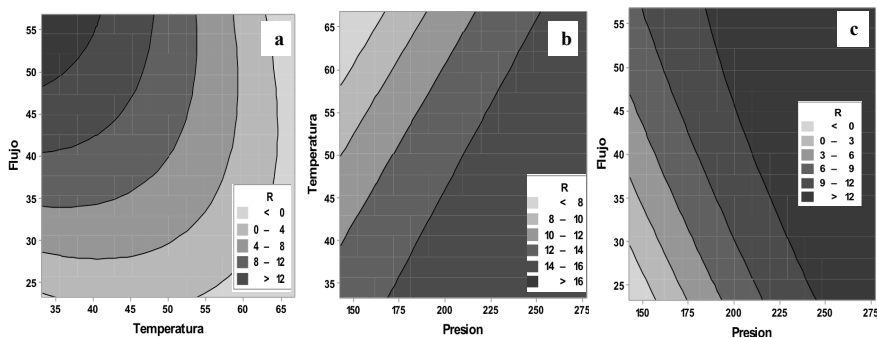
Fuente	GL	Suma cuadrados	Suma medias	Valor F	Valor P
<b>Modelo</b>	9	271,542	30,171	42,59	0
<b>Lineal</b>	3	229,762	76,587	108,11	0
Presión	1	143,655	143,655	202,77	0
Temperatura	1	55,552	55,552	78,41	0
Flujo	1	30,556	30,556	43,13	0
<b>Cuadrático</b>	3	10,679	3,56	5,02	0,036
PxP	1	9,737	9,737	13,74	0,008
TxT	1	3,231	3,231	4,56	0,07
FxF	1	2,012	2,012	2,84	0,136
<b>Interacción</b>	3	31,1	10,367	14,63	0,002
PxT	1	16,216	16,216	22,89	0,002
PxF	1	9,265	9,265	13,08	0,009
TXF	1	5,619	5,619	7,93	0,026
Error	7	4,959	0,708		
Lack-of-Fit	5	4,737	0,947	8,54	0,108
Error	2	0,222	0,111		
Total	16	276,501			

GL: grados de libertad

A mayores temperaturas (>60 °C) el R de extracción de aceite es mínimo o nulo, inclusive a mayores flujos no se mejora el rendimiento, pero a temperaturas menores y mayor flujo de CO<sub>2</sub> se obtienen mayores R (figuras 2a y 3a). Otra manera de lograr elevados rendimientos es a altas presiones y mayores flujos (figuras 2b y 3b), a baja temperatura y en el rango de las presiones en estudio también se obtiene mayor R, pero a alta temperatura se requiere mayor presión (Figs. 2c y 3c), esas condiciones de temperatura y presión permiten aumentar la densidad de CO<sub>2</sub>. Se requiere densidades de CO<sub>2</sub> de 0,8 g/ml o mayores para la extracción de lípidos y para lograr esa densidad se debe elevar la presión a medida que la temperatura sea mayor<sup>10</sup>.



**Figura 2.** Diagrama superficie respuesta a) Efecto de la T y F a 210 bar. b) Efecto de P y F a 50 °C. c) Efecto de a P y T a 40 g CO<sub>2</sub>/min



**Figura 3.** Diagrama de contorno de rendimiento de aceite a) Efecto del flujo y temperatura a 210 bar. b) Efecto de la temperatura y presión a 40 g CO<sub>2</sub>/min c) Efecto del flujo y presión a 50 °C

Los parámetros optimizados del rendimiento de aceite fueron 188 bar, 33,5 °C y 57 g/min, con esa condición se obtuvo un rendimiento de  $16,5 \pm 0,4$  %, superior al R obtenido con hexano ( $14,45 \pm 0,29$  %), a la grasa cruda de la semilla obtenido con éter dietílico ( $12,47 \pm 0,4$  %) y a los encontrados por Passos *et al.*<sup>11</sup>.

### Perfil de ácidos grasos

Los ácidos grasos encontrados de mayor a menor porcentaje fueron: linoléico (18:2), oléico (18:1), palmítico (16:0), esteárico (18:0), y en pequeñas cantidades el linolénico (18:3) (tabla 4), estuvieron en el rango encontrado por otros autores<sup>6</sup> y dentro de los rangos establecidos por el Codex Stan 210-1999. El resultado es prometedor para la valorización de la semilla de uva del residuo de elaboración de pisco, los ácidos grasos linoléico y oleico son de alto valor nutricional<sup>9</sup>

**Tabla 4.** Perfil de ácidos grasos del aceite de semilla de uva en g ácidos graso/100 g aceite.

Ácido graso	CO <sub>2</sub>	Hexano
C 16:0 (Palmítico)	6,71±0,2	7,52±0,4
C 18:0 (Esteárico)	4,81± 0,3	4,44±0,5
C 18:1 w-9 (Oleico)	20,17±0,3	19,65±0,4
C 18:2 w-6 (Linoléico)	66,69± 0,9	66,69±0,4
C 18:3 w-3 (α-Linolénico)	0,31±0,1	0,30±0,1
C 20:0 ( Araquídico)	0,21±0,1	0,16±0,1

### Valores de POV, anisidina, acidez libre e índice de yodo del aceite optimizado extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico en comparación con el aceite extraído con hexano

Los valores de POV del aceite extraído con CO<sub>2</sub> estuvieron debajo del límite (15 miliequivalentes de O<sub>2</sub>/kg aceite) establecido por el Codex Stan 210-1999, incluso el aceite extraído a la mayor temperatura (66,8°C), debido a que en esta técnica de extracción el CO<sub>2</sub> solubiliza el aceite de la semilla, se separa el CO<sub>2</sub> con el aceite y pasa a un separador con menor temperatura, y el aceite es colectado, en este caso, el aceite no tiene una exposición prolongada al calor en comparación con la técnica de extracción con hexano. En la tabla 5 se observa que el aceite extraído con hexano superó el límite establecido por el Codex Stan 210-1999, similar resultado al obtenido por Franco-Mora *et al.*<sup>12</sup>, los altos valores de POV es una consecuencia del proceso de extracción con solvente que favorece la descomposición de las cadenas de triglicéridos debido a la exposición prolongada a alta temperatura, acelerando el proceso de oxidación y afectando la calidad del aceite<sup>12</sup>. La técnica de extracción de aceite influye en el valor peróxido, el aceite obtenido mediante prensa mecánica presenta valores bajos de POV<sup>13</sup>.

En este trabajo los resultados de los valores de acidez y anisidina de ambas extracciones (tabla 5) fueron menores que el límite establecido por el Codex Stan 210-1999 y Codex on Fats and Oils<sup>14</sup>.

En relación al índice de yodo, el aceite extraído con CO<sub>2</sub> presentó valor cercano al rango inferior establecido por el Codex Stan 210-1999, Franco-Mora *et al.*<sup>12</sup> encontraron en la semilla de uva el valor de índice de yodo de 57,9 g/100 g, mencionaron que los bajos valores corresponden a un aceite altamente poliinsaturado, en ese caso el aceite contenía 90 % de ácidos grasos insaturados.

**Tabla 5.** Características químicas del aceite de semilla de uva Quebranta extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico y por el método convencional con el equipo soxhlet.

Aceite de semillas de uva Quebranta	Índice de peróxido (mEq/kg)	Índice de anisidina	Acidez libre (g oleico/100g aceite)	Índice de yodo (g/100g)
Extracción convencional (hexano)	38,44 ± 0,44	3,06 ± 0,15	0,82 ± 0,04	130,48 ± 0,06
Extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico	2,40 ± 0,07	2,30 ± 0,20	1,55 ± 0,40	126,90 ± 0,73

### La capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante del aceite extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico (7,80 mM equivalente Trolox) y con hexano (7,26 mM equivalente a Trolox) de la uva variedad quebranta del residuo del procesamiento de pisco, presentaron diferencia, posiblemente por efecto de la temperatura el aceite extraído con hexano presentó menor capacidad antioxidante (aproximadamente 7 % menos), por otro lado, Gómez y Huacayo<sup>15</sup> determinaron una mayor capacidad antioxidante en el aceite de semillas de uva variedad quebranta de Majes (Arequipa) extraído por prensado en frío (9,50 mM equivalente a Trolox), si bien es cierto la variedad de uva en estudio es la misma, esta diferencia puede deberse a la diferencia en la técnica de extracción o a la diferente zona de cultivo de la uva y/o que la semilla del presente trabajo es residuo del procesamiento de pisco, además, es importante mencionar que Gómez y Huacayo<sup>15</sup> lograron un menor rendimiento del aceite (7,2 %) que equivale al 44 % encontrado en el presente trabajo (16,5 %).

## CONCLUSIONES

- El análisis del diseño central compuesto permitió demostrar el efecto significativo de la temperatura, presión y flujo de CO<sub>2</sub>, así como la interacción de ellos sobre el rendimiento de aceite.
- Las condiciones óptimas de extracción de aceite de semilla de uva con CO<sub>2</sub> supercrítico, sugeridas por el método superficie respuesta, fueron 188 bar, 33,5 °C y 57 g/min, logrando mejorar el rendimiento de extracción de aceite.
- Los contenidos de ácido linoléico y ácido oleico, así como la actividad antioxidante del aceite de semilla de uva variedad Quebranta, son resultados prometedores para la valorización de la semilla, residuo de la elaboración de pisco.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a InnovatePerú por el financiamiento de la compra del equipo extractor Multisolvente Proyecto 315- PNICP –EC-2014, así mismo se agradece al Ing. Jorge Torres de la Cite Agroindustrial Ica por la recolección y envío de la muestra de orujo. Al Instituto Tecnológico de la Producción por brindar las facilidades de uso de los equipos e instalaciones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Programa de las Naciones Unidas (PNUD) y Centro de Innovación Tecnológica vitivinícola (CITEVID). La uva y el pisco. Potencialidades productivas. [Internet] 2004. [consultado 05 set 2017]. Disponible en: [http://cendoc.esan.edu.pe/fulltext/e-documents/PNUD/Pub\\_UvaPisco.pdf](http://cendoc.esan.edu.pe/fulltext/e-documents/PNUD/Pub_UvaPisco.pdf)
2. Duba KS, Fiori L. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics. *J Supercrit Fluids*. 2015; 98: 33-43.
3. Organización de las Naciones unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT). Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos 91. Granada, España; FAO. 2012
4. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray, SD, Kuszynski CA. *et al.* Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Rev Toxicol*. 2000; 148 (2-3): 187-197.
5. Fariás-Campomanes AM, Rostagno MA, Meireles AA. Production of polyphenol extracts from grape bagasse using supercritical fluids: Yield, extract composition and economic evaluation. *J Supercrit Fluids*. 2013; 77: 70–78.
6. Özcan, M, Ünver A, Gümüş T, Akin A. Characteristics of grape seed and oil from nine Turkish cultivars. *Nat Prod Res*. 2012; 26: 2024-2029.
7. Wen Xin, Zhu Minghui, Hu Rui, Zhao Jinhong, Chen Ziyi, Li Jingming. *et al.* Characterization of seed oils from different grape cultivars grown in China. *J Food Sci Technol*. 2016, 53(7), 3129–3136.
8. Fiori L. Grape seed oil supercritical extraction kinetic and solubility data: Critical approach and modeling. *J Supercrit Fluids*. 2007; 43: 43–54.
9. Aizpurua-Olaizola O, Ormazábal M, Vallejo A, Olivares M, Navarro P, Etebarria N, et al. Optimization of supercritical Fluid Consecutive Extraction of Fatty Acids and Polyphenols from *Vitis vinifera* Grape Wastes. *J Food Sci*. 2015; 80: 101-107.
10. Cunico LP, Turner C. Supercritical Fluids and Gas-Expanded Liquids. En F. Pena-Pereira y M. Tobiszewski (Eds.), *The Application of Green Solvents in Separation Processes*. Atlanta:Elsevier; 2017. p 155-214.
11. Passos C, Silva, R, Da Silva F, Coimbra M, Silva C. Enhancement of the supercritical fluid extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed. *J Supercrit Fluids*. 2009; 48: 225-229.
12. Franco-Mora, O, Salomon-Castaño J, Morales AA, Castañeda-Vildózola A, Rubí-Arriaga M. Ácidos grasos y parámetros de calidad del aceite de semilla de uva silvestre (*Vitis* spp.). *Scientia Agropecuaria*. 2015; 6(4): 271-278.

13. Navas PB. Composición química del aceite virgen obtenido por extracción mecánica de algunas variedades (*Vitis vinifera* L.) con énfasis en los componentes minoritarios. Arch Latinoam Nutr. 2009; 59(2): 214-219.
14. CODEX. Report of The 25th Session Of The Codex Committee On Fats And Oils. 27 February – 03 March 2017; Kuala Lumpur, Malaysia.
15. Gómez A, Huacayo LM. Efecto del aceite de semilla de *Vitis vinifera* L. (Uva) sobre la hipertensión arterial experimentalmente inducida en ratas. [Tesis de grado]. Arequipa, Perú: Universidad Católica de Santa María; 2014.

## INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE Se(IV) EN LA VIABILIDAD CELULAR DURANTE EL CRECIMIENTO DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

\*Carmen Rodríguez Best<sup>a,c</sup>, Jesús Américo Cjuno Huanca<sup>b</sup>, Mario Ceroni Galloso<sup>a</sup>

### RESUMEN

Se estudiaron los efectos inhibitorios de la concentración de Se(IV) en la curva de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN RC 212, para los que se desarrollaron cuatro réplicas del recuento celular y medidas de la densidad óptica durante 72 horas de cultivo. Los datos se ajustaron al modelo de Gompertz modificado con un nivel de confianza del 95 % y un coeficiente de determinación mayor a 0,90. Se utilizó el medio líquido YEPD (pH inicial 6) sometido a 30°C y 200 rpm, con adición de selenito después de transcurridas 5 horas de la inoculación. Las concentraciones evaluadas fueron 2, 4, 6, 8 y 10 mg Se(IV)/L, además del control. El máximo valor de biomasa fue de  $6,9 \times 10^7 \pm 4,7 \times 10^6$  células viables/mL y la mayor velocidad de crecimiento de  $0,646 \text{ h}^{-1}$  correspondiente a la concentración de 2 mg Se/L en el medio experimental. Según el ANOVA (Análisis de la Varianza), la LSD (Diferencia Mínima Significativa) y el porcentaje de células no viables, la inhibición del crecimiento de la levadura se presentó después de las 24 horas de cultivo, a las concentraciones de 6, 8 y 10 mg Se/L. También se demostró que la determinación espectrofotométrica de Se(IV) en el medio experimental, por el método yodo-almidón ha sido factible.

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

## INFLUENCE OF Se(IV) CONCENTRATION ON CELULAR VIABILITY DURING YEAST *Saccharomyces cerevisiae* GROWTH

### ABSTRACT

We have studied the inhibitory effect of Se(IV) concentration on *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN RC 212 in 4 replicates of cell count and optic density for a 72 hours culture. Values were adjusted to the modified Gompertz model with a confidence level of 95 % and a determination coefficient higher than 0,90. We used the YEPD liquid medium (pH=6 at

<sup>a</sup> Unidad de Posgrado de la Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 23, Perú,

<sup>b</sup> Titular gerente de Fractal Químicos EIRL- [www.fractalquimicos.pe](http://www.fractalquimicos.pe)

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



the beginning) at 30 °C and 200 rpm, with added selenite 5 hours after inoculation. The analysed concentrations were 2, 4, 6, 8 y 10 mg Se(IV)/L and the control. The highest value of biomass was  $6,9 \times 10^7 \pm 4,7 \times 10^6$  viable cells /mL and the highest growth speed was  $0,646 \text{ h}^{-1}$ , which correspond to the concentration of 2 mg Se/L in the experimental medium. According to ANOVA (Analysis of Variance), LSD (Least Significance Difference) and the percentage of nonviable cells, the inhibition of yeast growth appeared 24 hours after inoculation, for the concentrations 6, 8 y 10 mg Se/L. The feasibility of iodine-starch method for spectrophotometric determination of Se(IV) in culture was also demonstrated.

**Key words:** selenium, yeast, selenite, selenium yeast, yeast grow, Gompertz, cellular viability

## INTRODUCCIÓN

El selenio es un nutriente esencial a nivel de trazas, algunos de sus compuestos tienen propiedades antioxidantes y juegan un rol preventivo en ciertos tipos de cáncer, en humanos y animales, por eso, una dieta deficiente en selenio debe ser mejorada con el consumo de suplementos nutricionales como la selenio-levadura. La selenio-levadura o levadura selenizada, ha sido el producto natural más ampliamente investigado, una de las razones es su capacidad de suministrar formas de selenio orgánico más biodisponibles, algunas de las cuales se encuentran naturalmente en ciertos alimentos. Este producto natural se obtiene mediante el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de cultivo al que se adiciona selenio en forma de selenito de sodio (selenización). Las especies de selenio, que se forman durante el crecimiento, dependen de la paulatina asimilación del Se(IV) por la levadura, proceso que está influenciado por factores como: la cepa, la composición del medio de cultivo, las condiciones del cultivo y la cantidad de selenito adicionado<sup>1</sup>.

La complejidad y variabilidad de los procesos metabólicos en la levadura requieren el control de su crecimiento, que se realiza con la medida de la densidad óptica (DO), el recuento de células de levadura y el cálculo del porcentaje de células viables y no viables. La medida de la DO es una forma rápida y fácil de estimar el crecimiento de la biomasa, sin embargo, contar el número de células o determinar la viabilidad celular de la levadura también es un ensayo accesible, que permite estimar la condición de la población celular, pues una disminución en la viabilidad celular indica inhibición del crecimiento y la inducción de la respuesta al estrés, suministrando información sobre el efecto de factores en el entorno celular<sup>2</sup>. Otro aspecto de interés es conocer la concentración de Se(IV) en el medio experimental, durante el proceso de selenización. Al respecto, Kieliszek et al. utilizan, con buenos resultados, una técnica espectrofotométrica para cuantificar el Se(IV) y calcular el selenio vinculado a la biomasa de la levadura<sup>3</sup>. La técnica se basa en la siguiente reacción de óxido-reducción:  $\text{SeO}_3^{2-} + 4\text{I}^- + 6\text{H}^+ \rightarrow \text{Se} + 2\text{I}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$ , y el desarrollo de color se obtiene por la reacción entre la variamina azul y el yodo<sup>4</sup>, aún cuando, es factible trabajar con almidón, que forma un complejo azul con el yodo, para la misma reacción<sup>5</sup>.

Según Brozmanová *et al.*, mencionados por Herrero y Wellinger, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no tiene necesidad metabólica por selenio, lo que facilita el estudio de los efectos tóxicos de formas de selenio en sus funciones celulares<sup>6</sup>. En el caso del Se(IV), la cantidad presente en el medio de cultivo puede ser tóxica e inhibir el crecimiento de la levadura<sup>7</sup>, lo que justifica la evaluación de la incidencia de su concentración en la viabilidad celular. En algunos trabajos, los investigadores han estudiado aspectos relacionados al tipo de medio de cultivo, preparación y cantidad de inóculo, tipo y viabilidad de la cepa de levadura así como la forma y momento de incorporación del selenito al medio de cultivo, principalmente para concentraciones de 10 a 60 mg Se/L<sup>8-11</sup>, aunque también se han utilizado concentraciones de 19 a 57  $\mu$ M (1,6; 3,1 y 4,5 mg Se/L, aproximadamente)<sup>7</sup>, todos ellos con el propósito de alcanzar la estandarización y control del mencionado proceso; sin embargo, los esfuerzos por establecer la concentración de Se(IV) adecuada para el crecimiento de la biomasa de levadura continúan.

El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la influencia de diferentes concentraciones de Se(IV) en la viabilidad celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante el crecimiento y determinar su contenido en el medio experimental con el método espectrofotométrico yodo-almidón.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material biológico

Para la obtención de las curvas de crecimiento se ha utilizado la levadura seca activa, Lalvin RC 212 (Bourgovin, GMO and gluten free). *Saccharomyces cerevisiae* producida por Lallemand INC. Montreal Qc, Canada HIW 2N8.

### Reactivos

En la preparación del medio de cultivo se utilizó glucosa anhidra Fisher Scientific ACS certificada; extracto de levadura US Biological, grado biología molecular; peptona BD Bacto peptona y agua destilada.

La solución de selenito se preparó con selenito de sodio P.A. (99 %) Panreac Appli Chem y para el recuento celular se utilizó azul de metileno Riedel de Haen para microscopía. En la preparación de las soluciones para el método yodo-almidón se utilizó HCl Baker ACS (36,5-38 %), yoduro de potasio (99 %) Merck Emsure y almidón soluble Scharlau, además de agua destilada.

### Equipos

Autoclave ALP modelo CLG-32L/40M/40L, cabina de bioseguridad Biobase modelo 11231BBC86MSC Clase II, agitador orbital Thermo Scientific MAXQ 7000, espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Electron Corporation, pHmetro UB-10 Denver Instrument, microscopio Olympus modelo CX31RBSFA, cámara Neubauer- BOECO Germany, bright line, modelo Tiefe Depth. Profondeur (0.100 mm - 0.0025mm<sup>2</sup>).

## Metodología

### Preparación del medio de cultivo

Tanto el medio de cultivo líquido YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), que se preparó según la composición de la tabla 1, como la solución de selenito de sodio (conteniendo 1000 mg Se/L) fueron autoclavados a 121°C y 16 lb/pulg<sup>2</sup> durante 20 minutos.

**Tabla 1.** Composición del medio de cultivo YEPD.

COMPONENTE	g/L
Extracto de levadura	10,0
Peptona	20,0
Glucosa	20,0

### Preparación del inóculo

Se pesó 0,011 g de levadura seca activa, LALVIN RC 212, que se adicionó a 50 mL de YEPD estéril, en un matraz erlenmeyer de 250 mL. El matraz se colocó en baño maría a  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 15 minutos (según indicaciones del fabricante), después se retiró, se mezcló el YEPD con la levadura y se continuó con la agitación a 30°C y 200 rpm durante 24 horas<sup>3</sup>.

### Adición de selenito

En la cámara de bioseguridad, se adicionaron 5 mL de inóculo (cultivo de 24 horas de *Saccharomyces cerevisiae*, LALVIN RC 212 que contenía  $4,5$  a  $5,5 \times 10^7$  cel/mL) a cada matraz erlenmeyer de 250 mL conteniendo 45 mL de medio líquido YEPD autoclavado. Después de inocular, los matraces, debidamente acondicionados, se colocaron en el agitador a 30°C y 200 rpm. Posteriormente, se midió el pH inicial del YEPD autoclavado. Transcurridas 5 horas de crecimiento, se agregaron volúmenes de solución de selenito de sodio en todos los medios experimentales, excepto en uno (control), con el propósito de obtener concentraciones de 0 (control), 2, 4, 6, 8 y 10 mg Se/L. Posteriormente, se continuó la agitación de todos ellos a 30°C y 200 rpm hasta completar 72 horas de cultivo<sup>3</sup>.

### Densidad óptica y viabilidad

Se realizaron cuatro repeticiones de las mediciones de DO y de recuento celular, la DO se realizó a 600 nm según el procedimiento descrito por Kieliszek *et al.*<sup>3</sup> y para el recuento celular se utilizó la tinción con azul de metileno, para calcular el número de células viables y no viables<sup>12</sup> para cada una de las concentraciones de Se(IV)/L; cada hora durante 12 horas; luego cada dos horas hasta las 24 horas y finalmente cada cuatro horas hasta las 72 horas.

### Determinación de Se(IV) con el método yodo-almidón

El método espectrofotométrico propuesto por Narayana *et al.* se basa en la reacción del selenito y el yoduro de potasio en medio ácido, que libera yodo y forma un complejo de

color azul con el almidón, con máxima absorbancia a 570 nm. Los estándares se prepararon en fioas de 10 mL, con volúmenes de la solución de trabajo de Se(IV); 1,0 mL de KI al 2 % (p/v); 1,0 mL de HCl 2M y 0,2 mL de almidón al 1 % (p/v)<sup>5</sup>. La solución stock de 1000 mg Se(IV)/L se preparó con selenito de sodio y luego las soluciones de trabajo se prepararon mediante dilución de la solución stock. Se verificó el  $\lambda_{\max}$  con el estándar de 0,6 mg Se/L y el blanco. Después se prepararon los estándares a concentraciones de 0 a 1,0  $\mu\text{g Se/mL}$  en fioas de 10 mL, sin y con adición del medio YEPD (0,5 mL), volúmenes de la solución de trabajo de Se(IV); 1,0 mL de KI al 2 % (p/v); 1,0 mL de HCl 2M y 0,2 mL de almidón al 1 % (p/v), se llevaron a aforo con agua destilada, se homogeneizaron y las mediciones de absorbancia se realizaron a 570 nm. La determinación de Se(IV) en la muestra se realizó en el sobrenadante del medio experimental recuperado a las 24, 48 y 72 horas de cultivo para cada concentración de adicionada. Luego de centrifugar 1 mL del medio a 5000 rpm x 5 minutos durante la medida de la DO, se decanta, filtra y mide 0,5 mL que se adiciona a fioas de 10 mL; posteriormente, se adiciona 1,0 mL de KI al 2 % (p/v); 1,0 mL de HCl 2M y 0,2 mL de almidón al 1% (p/v), se lleva a aforo, se homogeneiza y mide a 570 nm.

### Pruebas estadísticas

La evaluación de la cinética de crecimiento de la levadura se realizó utilizando el modelo matemático de Gompertz<sup>13</sup>. El modelamiento matemático se realizó con un nivel e confianza del 95 % teniendo en cuenta el coeficiente de determinación  $R^2 (> 0,90)$ . Se utilizó el paquete estadístico R 3.2.5, con los paquetes: “nls2” y “proto”.

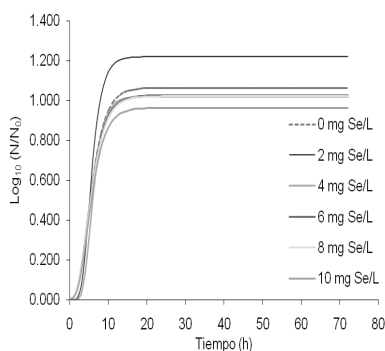
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Modelamiento de las curvas de crecimiento

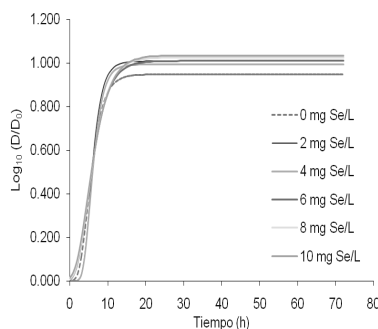
Las cuatro réplicas de mediciones de DO (31 por réplica) y recuento de células viables (31 por réplica) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN RC 212, para cada concentración de Se(IV) (0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg/L), en el medio experimental YEPD, a pH inicial de 6, a 30°C y 200 rpm durante 72 horas, permitieron el ajuste al modelo de Gompertz modificado, con la ecuación:  $Y = a * \exp(-\exp(b-c*T))$ , donde **a** corresponde al máximo valor de biomasa (cel/mL), **b** es la velocidad de crecimiento respecto al tiempo [(log (cel/mL)/ h)] y **c** es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad (horas). Todos los coeficientes hallados en el modelamiento (**a**, **b** y **c**) fueron significativos ( $p < 0,05$ ) para cada concentración de selenio. Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) fueron superiores a 0,90 para todas y cada una de las concentraciones de Se(IV) y la prueba de Shapiro-Wilk mostró que los residuales cumplen con distribuirse normalmente para cada una de las concentraciones de Se (IV), 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg /L.

A partir de los coeficientes se generaron los valores de las curvas de crecimiento de las figuras 1 y 2. En la figura 1 se aprecia que el número de células viables (en unidades logarítmicas) es mayor en el medio que contenía 2 mg Se/L que en las demás concentraciones (4, 6, 8, 10 mg Se/L), incluso mayor que en el control; mientras que para la figura 2 el mayor valor de DO (unidades logarítmicas) corresponde al medio con 10 mg Se/L, aunque se observa

una mayor cercanía a los valores de las demás concentraciones (2, 4, 6, 8 mg Se/L). La explicación de los diferentes comportamientos en cada figura se relaciona con la naturaleza de las mediciones, en el primer caso se tiene la curva de crecimiento en función de las células viables de la levadura, y en el otro la medida de la DO corresponde a la turbidez producida por el número total de células de levadura (viables y no viables).



**Figura 1.** Curva de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN RC 212, según el modelo Gompertz modificado en función del número de células viables/mL.



**Figura 2.** Curva de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN RC 212, según el modelo Gompertz modificado en función de la DO.

Según los parámetros cinéticos que se aprecian en la tabla 2, el máximo valor de biomasa de  $6,9 \times 10^7 \pm 4,7 \times 10^6$  células viables /mL y la mayor velocidad de crecimiento de  $0,646 \text{ h}^{-1}$  corresponden a la concentración de 2 mg Se/L en el medio experimental y el menor tiempo de latencia se presenta para la concentración de 10 mg Se/L. Este comportamiento para los valores de biomasa y velocidad de crecimiento se explican porque al ingresar el selenio a las células de *S. cerevisiae*, e interferir con los procesos celulares, también puede producirse la activación de rutas metabólicas requeridas para la desintoxicación y tolerancia al selenio<sup>6</sup>, por tal razón, se logran mayores valores con la menor concentración. Por otro lado, en el caso de la latencia, la concentración de Se(IV) en el medio experimental no influye en la viabilidad, pues la adición de selenito de sodio se realizó a las cinco horas de la inoculación.

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos del recuento de células viables.

mg Se/L	Valor máximo de biomasa (a) (cel/mL)	Tiempo de latencia ( $\lambda$ ) [h]	Velocidad específica de crecimiento $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Tiempo de generación G (h)
0	$5,0\text{E}+07 \pm 1,6\text{E}+07$	$2,041 \pm 0,385$	$0,430 \pm 0,076$	$1,654 \pm 0,315$
2	$6,9\text{E}+07 \pm 4,7\text{E}+06$	$2,743 \pm 1,288$	$0,646 \pm 0,143$	$1,114 \pm 0,246$
4	$4,7\text{E}+07 \pm 2,0\text{E}+07$	$3,102 \pm 1,535$	$0,525 \pm 0,053$	$1,331 \pm 0,134$
6	$4,7\text{E}+07 \pm 1,9\text{E}+07$	$2,021 \pm 0,475$	$0,422 \pm 0,085$	$1,696 \pm 0,341$
8	$4,6\text{E}+07 \pm 1,7\text{E}+07$	$1,988 \pm 0,433$	$0,410 \pm 0,077$	$1,737 \pm 0,336$
10	$4,3\text{E}+07 \pm 2,3\text{E}+07$	$1,974 \pm 0,921$	$0,393 \pm 0,120$	$1,953 \pm 0,830$

En la tabla 3 se muestran los parámetros cinéticos de DO, donde el máximo valor de biomasa de  $0,976 \pm 0,096$  y el menor tiempo de latencia de  $0,745 \pm 2,237$  corresponden a 10 mg Se/L, no obstante que la mayor velocidad específica de crecimiento y el menor tiempo de generación corresponden a la concentración de 2 mg Se/L, comportamiento que coincide con el encontrado en función de la viabilidad celular.

**Tabla 3.** Parámetros cinéticos de densidad óptica.

mg Se/L	Valor máximo de biomasa (densidad óptica)	Tiempo de latencia ( $\lambda$ ) [h]	Velocidad específica de crecimiento $\mu$ ( $h^{-1}$ )	Tiempo de generación G (h)
0	$0,796 \pm 0,036$	$2,408 \pm 0,523$	$0,431 \pm 0,098$	$1,667 \pm 0,352$
2	$0,918 \pm 0,091$	$3,308 \pm 0,898$	$0,567 \pm 0,094$	$1,248 \pm 0,215$
4	$0,890 \pm 0,134$	$3,322 \pm 0,989$	$0,547 \pm 0,108$	$1,300 \pm 0,216$
6	$0,921 \pm 0,102$	$0,860 \pm 2,794$	$0,348 \pm 0,160$	$2,743 \pm 2,214$
8	$0,954 \pm 0,087$	$0,989 \pm 2,371$	$0,346 \pm 0,152$	$2,593 \pm 1,836$
10	$0,976 \pm 0,096$	$0,745 \pm 2,237$	$0,330 \pm 0,155$	$2,743 \pm 1,909$

Al aplicar el estadístico de Levene a las mediciones de DO, todos los parámetros: valor máximo de biomasa, tiempo de latencia, velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación, cumplen con la homogeneidad de varianzas ( $p > 0,05$ ), mientras que de los parámetros para viabilidad celular, sólo la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de generación cumplen con la homogeneidad de varianzas. Es probable que la estimación del valor máximo de biomasa y el tiempo de latencia, en función del recuento de células viables, no cumplan con la homogeneidad, porque para estimar la condición de la población de levadura, se requiere de la actividad reductora de las células de levadura, que son las que transforman el azul de metileno en su forma incolora, mientras las células muertas (no viables) se tiñen de azul<sup>12</sup>.

En el ANOVA (Análisis de la Varianza) se encontraron diferencias significativas en el valor máximo de biomasa, el tiempo de latencia y la velocidad específica de crecimiento, para las diferentes concentraciones de selenio en el caso de viabilidad celular. Para la DO no hay evidencia suficiente para determinar efecto significativo. La prueba de LSD (Diferencia Mínima Significativa) confirma que el valor máximo de biomasa es  $6,9 \times 10^7 \pm 4,7 \times 10^6$  células/mL y el valor más alto de velocidad específica de crecimiento, corresponden a un contenido de 2 mg de Se (IV)/L en el medio experimental, y el menor tiempo de latencia se presenta para las concentraciones de 6, 8 y 10 mg Se(IV) /L.

Respecto a los resultados obtenidos para el porcentaje de células no viables, como se aprecia en la tabla 4, se incrementa en función del tiempo y conforme es mayor la concentración de Se(IV) en el medio de cultivo. Las concentraciones de 4, 6, 8 y 10 mg Se(IV)/L tienen un porcentaje igual o superior al 10 % después de las 48 horas de cultivo y las biomásas cultivadas durante 72 horas presentaron color rosado para las concentraciones de 6, 8 y 10 mg Se (IV)/L. Por eso, Marinescu y Stoicescu mencionan que el color de los productos de selenio-

levadura dependen del contenido de selenio, así, los productos con bajo contenido, exhiben un color crema, con contenido medio color rosado y para aquellos con alto contenido color rojo<sup>11</sup>. Este comportamiento también coincide con lo descrito en una reciente investigación, donde se explica que la coloración rojiza en la biomasa celular ocurre por los procesos de desintoxicación realizados por la levadura<sup>14</sup>.

Según los estudios realizados, los compuestos inorgánicos de selenio, como el selenito, pueden ser metabolizados dentro de la célula, en un proceso que involucra al glutatión reducido (GSH) con la consiguiente formación de glutatión oxidado (GSSG) y las especies de oxígeno reactivo (ROS)<sup>6</sup>. Entonces, el selenito cambia la relación GSH: GSSG, mediante la oxidación del GSH, inhibiendo fases de la división celular y síntesis de proteínas, afectando las enzimas, pudiendo causar daño al DNA e inducir apoptosis<sup>7</sup>, lo que se refleja en los mayores incrementos de los porcentajes de células no viables en las concentraciones de 6, 8 y 10 mg Se(IV)/L, con valores cercanos al 30 % para 10 mg Se/L a las 72 horas de cultivo (28, 9 %).

**Tabla 4.** Porcentaje de células no viables en función del tiempo y la concentración de Se(IV) en el medio experimental.

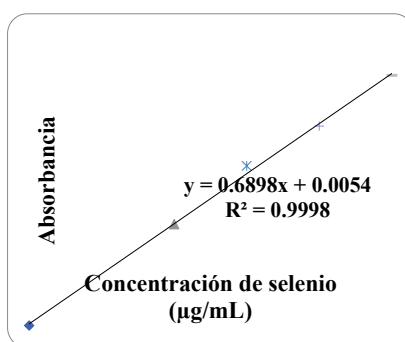
Tiempo (horas)	% de Células No Viables					
	0 mg Se/L	2 mg Se/L	4 mg Se/L	6 mg Se/L	8 mg Se/L	10 mg Se/L
28	0,9	1,9	1,4	2,2	3,1	3,4
32	2,1	4,0	4,5	6,0	6,0	7,0
36	4,0	5,0	4,0	8,3	7,5	11,0
40	4,1	5,4	6,4	10,0	9,0	12,5
44	4,7	5,7	7,7	13,9	10,0	13,6
48	8,5	5,7	10,1	14,2	10,3	14,4
52	8,6	8,9	13,4	14,1	11,4	21,5
56	10,3	10,1	17,5	14,7	13,6	19,7
60	10,9	12,2	16,8	15,0	15,3	20,7
64	11,5	11,7	16,8	18,4	18,0	22,3
68	12,5	12,9	16,7	20,1	16,9	25,2
72	13,3	12,4	18,0	22,7	24,1	28,9

### Determinación de Se(IV) en el medio experimental

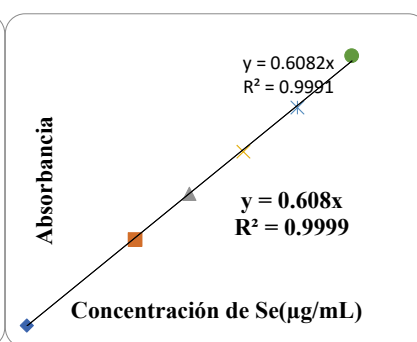
El espectro de absorción para el método yodo-almidón permitió confirmar la longitud de onda de trabajo a 570 nm. La ecuación de la curva de calibración dio  $y = 0,7611x + 0,1856$  con  $R^2 = 0,9989$  y las pruebas de recuperación con estándares de 0,4; 0,6 y 0,8  $\mu\text{g Se(IV)/mL}$ , para 4 repeticiones dieron valores de  $98,90 \pm 0,30 \%$ ;  $99,30 \pm 0,20 \%$  y  $99,07 \pm 0,33 \%$ , respectivamente.

Las curvas de calibración con la adición de YEPD fueron  $y = 0,6898x + 0,0054$  con un  $R^2$  de 0,9998 cuando se adiciona 0,5 mL de YEPD estéril para un rango de concentraciones de 0 a 1,0  $\mu\text{g Se(IV)/mL}$ , como se observa en la figura 3 y cuando se adicionó 0,5 mL de YEPD (después de 72 horas de cultivo), se obtuvo la ecuación  $y = 0,608x$  con un  $R^2 = 0,9999$  para

un rango de concentraciones de 0 a 1,2  $\mu\text{g Se(IV)/ mL}$  (figura 4); sin embargo, las pruebas de recuperación dieron valores inferiores a 98 %. Aunque los valores de los coeficientes de Pearson se aproximan a 1, para ambas ecuaciones, es evidente que los componentes del medio YEPD se modifican durante el cultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin RC 212, en las diferentes etapas de crecimiento (latencia, logarítmica, estacionaria, letal). Este comportamiento indica que el efecto matriz del medio estéril es diferente de aquel después de la inoculación. Al aplicar el método espectrofotométrico yodo-almidón a las muestras de los medios experimentales, sólo se logró cuantificar el selenio en el medio que contenía 10 mg Se/L inicialmente, con valores de 6,8 mg Se/L a las 24 horas; 4,6 mg Se/L a las 48 horas y 3,0 mg Se/L a las 72 horas de cultivo, lo que implica una incorporación de 70 % del Se(IV) a la biomasa de levadura, durante 67 horas desde la adición del selenito al medio de cultivo.



**Figura 3.** Curva estándar de Se(IV) a 570 nm en presencia de medio YEPD estéril.



**Figura 4.** Curva estándar de Se(IV) a 570 nm en presencia de medio YEPD de 72 hrs de cultivo.

Considerando los resultados del modelamiento realizado, del ANOVA, la LSD y el porcentaje de células no viables, las concentraciones de 6, 8 y 10 mg Se(IV)/L en el medio de cultivo YEPD en las condiciones mencionadas, inhiben el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN RC 212.

## CONCLUSIONES

Las medidas de DO y número de células viables /mL permite modelar el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin RC 212, según el modelo de Gompertz modificado, en el medio YEPD a un pH inicial de 6, a 30°C y 200 rpm, por un periodo de 72 horas. El análisis estadístico indica que hay evidencia de diferencia significativa en los valores de viabilidad celular para la concentración de 2 mg Se(IV) respecto a las de 0, 4, 6, 8 y 10 mg de Se(IV). La inhibición del crecimiento de la levadura se presenta después de las 24 horas de cultivo, como pérdida de viabilidad o mayor porcentaje de células no viables, a las concentraciones de 6, 8 y 10 mg Se/L. Además, es factible la determinación espectrofotométrica de Se(IV) en el medio experimental, por el método yodo-almidón aunque deben mejorarse aspectos de la cuantificación.



## AGRADECIMIENTO

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

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kieliszek M, Blazejak S, Gientka L, Bzducha-Wrobel A. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015; 99: 5373-5382.
2. Jamnik P, Raspor P. Methods for Monitoring Oxidative Stress Response in Yeasts. *J Biochem Mol Toxicol.* 2005; 19 (4): 195-203.
3. Kieliszek M, Blazejak S, Placzek M. Spectrophotometric evaluation of selenium binding by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC MYA-2200 and *Candida utilis* ATCC9950 yeast. *J Trace Elem Med Biol.* 2016; 35: 90-96.
4. Revanasiddappa HD, Kiran Kumar TN. A Facile Spectrophotometric Method for the Determination of Selenium. *Anal Sci.* 2001; 17:1309-1312.
5. Narayana B, Mathew M, Bhat NG, Sreekumar NV. Spectrophotometric Determination of Selenium Using Potassium Iodide and Starch as Reagents. *Microchim Acta.* 2003; 141:175-178.
6. Herrero E, Wellinger RE. Yeast as a model system to study metabolic impact of selenium compounds. *Microb Cell.* 2015; 2 (5): 139-149.
7. Kaur T, Bansal MP. Selenium enrichment and anti-oxidant status in baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* at different sodium selenite concentrations. *Nutr Hosp.* 2006; 21(6): 704-708.
8. Rajashree K, Muthukumar T. Selection of culture medium and conditions for the production of selenium enriched *Saccharomyces cerevisiae*. *Afr J Biotechnol.* 2013; 12(20): 2972- 2977.
9. Ponce de León CA, Bayón MM, Paquin C, Caruso JA. Selenium incorporation into *Saccharomyces cells*: a study of different incorporation methods. *J Appl Microbiol.* 2002; 92: 602-610.
10. Suhajda Á, Hegóczki J, Janzso B, Pais I, Vereczkey G. Preparation of selenium yeasts. I Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. *J Trace Elem Med Biol.* 2000; 14:43-47.
11. Marinescu G, Stoicescu AG. Industrial nutrient medium use for yeast selenium preparation. *AUDJG- Food Technology.* 2011; 35(1):45-53.
12. Castelucci F. Análisis microbiológico del vino y del mosto: Recuento de células de levadura-tinción de células de levadura con azul de metileno. [Internet] Resolución OIV/OENO 206/2010. [actualizado 21 mayo 2018]. Disponible en: <http://www.oiv.int/public/medias/1245/oiv-oen-206-2010-es.pdf>.

13. Aguilar J, Espinoza M, Cabanillas J, Avila I, García A, Julca J et al. Evaluación de la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. *Agroind Sci.* 2015; 5(1):37-47.
14. Kieliszek M, Blazejak S, Kurek E. Binding and Conversion of Selenium in *Candida utilis* ATCC 9950 Yeasts in Bioreactor Culture. *Molecules.* 2017 Feb 25; 22(3). pii: E352. doi: 10.3390/molecules22030352.

## EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ACUMULADORA DE Cd(II), Pb(II) y Cr(VI) POR COLONIAS DE *Nostoc commune* "MURMUNTA"

Stamber Ramírez Revilla<sup>a</sup>, Jeaneth Medina Pérez<sup>b</sup>, José Villanueva Salas<sup>b</sup>

### RESUMEN

En este estudio se evaluó la acumulación de Cd(II), Pb(II) y Cr(VI) por colonias de *Nostoc commune* "murmunta", llevada a cabo en cultivos hidropónicos, la cuantificación de Cd(II) y Pb(II) fue realizada por voltamperometría de redisolución anódica y la del Cr(VI) por espectrofotometría con difenilcarbazida. Un total de 330 colonias de cianobacterias fueron distribuidas en 10 grupos experimentales. Para la determinación de la acumulación de Cd(II) y Pb(II) se tomaron muestras del líquido interno de las colonias de cianobacterias, seleccionadas en forma aleatoria, cada tres días por un periodo de 21 días y para el caso del Cr(VI) cada cuatro días por un periodo de 28 días.

Los resultados demostraron que las colonias se desarrollan en un medio sin condiciones exigentes, ni tratamientos previos y son de fácil recolección. La mayor concentración acumulada de Pb(II) fue de 80,40 mg/L en el duodécimo día (contenedor 160 mg/L) equivalente a 3589,29 mg/kg de murmunta seca; Cd(II) de 65,70 mg/L en el noveno día (contenedor 160 mg/L) equivalente a 2906,25 mg/kg de murmunta seca y Cr(VI) de 4,52 mg/L al duodécimo día (contenedor 30 mg/L) equivalente a 201,64 mg/kg de murmunta seca.

**Palabras clave:** *Nostoc commune*, acumulación, Cd(II), Pb(II), Cr(VI).

## EVALUATION OF THE SORPTION CAPACITY OF Cd(II), Pb(II) AND Cr(VI) BY COLONIES OF *Nostoc commune* "MURMUNTA"

### ABSTRACT

This study evaluated the accumulation of Cd(II), Pb(II) and Cr(VI) by colonies of *Nostoc commune* "murmunta", carried out in hydroponics, the quantification of Cd(II) and Pb(II) was performed by Anodic Stripping voltammetry and for Cr(VI) by spectrophotometry with diphenylcarbazine. A total of 330 colonies of cyanobacteria were distributed in 10 experimental groups. For the determination of the accumulation of Cd(II) and Pb(II) samples

---

<sup>a</sup>Universidad Tecnológica del Perú (UTP), Avda. Tacna y Arica 160. Arequipa-Perú. sramirezr@utp.edu.pe

<sup>b</sup>Laboratorio del Proyecto Mercurio, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Universidad Católica de Santa María (UCSM), Urb. San José s/n Umacollo, Arequipa-Perú.

were taken from the internal fluid of the colonies of cyanobacteria, selected at random, every 3 days for a period of 21 days and in the case of the Cr(VI) every 4 days for a period of 28 days.

The results demonstrated that the colonies develop without being subjected to strict growing conditions or prior treatments and are very easy to collect. The greatest concentration of accumulated Pb(II) was 80,40 mg/L on the twelfth day (container with 160 mg/L), equivalent to 3589,29 mg/kg of dry murmunta; Cd(II) was 65,70 mg/L on the ninth day (container 160 mg/L), equivalent to 2906,25 mg/kg of dry murmunta and Cr(VI) was 4,52 mg/L on the twelfth day (container 30 mg/L), equivalent to 201,64 mg/kg of dry murmunta.

**Key words:** *Nostoc commune*, accumulation, cadmium, lead, chromium.

## INTRODUCCIÓN

La emisión constante al ambiente de sustancias contaminantes, proceden de actividades industriales, mineras, agropecuarias, artesanales y domésticas<sup>1</sup>. Hoy tenemos un sin número de sustancias químicas y biológicas en el ambiente que significan un riesgo para la salud porque se encuentran en altas concentraciones o debido a su naturaleza tóxica<sup>2</sup>.

El Perú es un país privilegiado por su biodiversidad y todas las riquezas naturales que posee, una de ellas son los yacimientos mineros, gran fuente de riqueza y trabajo para todos los peruanos, pero también son la principal fuente de destrucción de ecosistemas y uno de los problemas más resaltantes es la contaminación del agua, provocando, en muchos casos, la desertificación de ricos valles y la extinción de diversas especies.

En los últimos años se han empezado diversas investigaciones que dan como resultado alternativas para prevenir y restaurar los daños ocasionados por el crecimiento industrial. Una de ellas es la biorremediación, donde se remueve y degrada los contaminantes localizados en suelos y lechos acuáticos<sup>3</sup>.

La fitorremediación es una tecnología barata y con gran potencialidad en el saneamiento y recuperación de suelos<sup>4</sup>. La ficorremediación es una técnica novedosa, de bajo costo y efectiva que utiliza algas para limpiar aguas residuales, ofreciendo un método muy simple y económico en comparación con los otros tratamientos convencionales<sup>5</sup>.

Ficorremediación comprende varias aplicaciones: (i) eliminación de nutrientes de aguas residuales, municipales y efluentes ricos en materia orgánica; (ii) eliminación de compuestos nutrientes y xenobióticos con la ayuda de biosorbentes a base de algas; (iii) tratamiento de aguas residuales ácidas y metálicas; (iv) captación de CO<sub>2</sub>; (v) transformación y degradación de xenobióticos; y (vi) detección de compuestos tóxicos con la ayuda de biosensores basados en algas<sup>6</sup>.

El *Nostoc* está formado por colonias de cianobacterias verde azuladas, verde oliva o marrón. El color verde viene de su contenido de clorofila, el azul, de un pigmento denominado Ficocianina, que tiene relación con la fotosíntesis. Algunos contienen Ficoeritrina, pigmento rojo, que al mezclarse con los otros generan la coloración marrón<sup>7</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad acumuladora de colonias de *Nostoc commune* sobre lechos acuáticos contaminados con Cd(II), Cr(VI) y Pb(II), teniendo en cuenta que es un alga que no necesita de medios exigentes para su crecimiento ni tratamientos previos y que la encontramos abundantemente como parte de la biodiversidad de nuestro país, por lo que su utilización es adecuada y económica.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material biológico

Para la evaluación del presente estudio se utilizó colonias de cianobacterias *Nostoc commune* "murmunta", adquiridas en un mercado local, hidratadas por 24 h en agua destilada y mantenidas en contenedores de polietileno de alta densidad en medio hidropónico y temperatura ambiente hasta su empleo. Las colonias fueron mantenidas con fotoperiodos de luz indirecta de 10 a 12 h por día.

### Equipos y reactivos

Todos los reactivos químicos usados fueron de grado analítico o superior: solución estándar de Cd(II) y Pb(II) (1000 ppm) CertiPUR (Merck), dicromato de potasio (Merck), buffer acetato de sodio pH 4,60, ácido nítrico (Merck), ácido sulfúrico 0,20 M y solución de difenilcarbazida en acetona 5000 ppm. Todas las soluciones fueron preparadas con agua calidad ultrapura (18,2 MΩ) obtenida con un equipo EASY pure II.

Las determinaciones de Cd(II) y Pb(II) fueron realizadas usando una estación voltamperométrica 757 VA COMPUTRACE de Metrohm, que consta de un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl 3 M. Para las determinaciones de Cr(VI) se hizo uso de un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent).

### Contaminación de las colonias

Se seleccionó un total de 330 cianobacterias y se repartió aleatoriamente 30 a cada contenedor al cual se le agregó 1,5 L de medio hidropónico. Una vez colocadas las cianobacterias en cada contenedor se procedió a determinar los valores basales de Cd(II), Cr(VI) y Pb(II). Luego se procedió a contaminar cada contenedor: Grupo "A" y "B" Cd(II) (80 y 160 ppm, respectivamente); Grupo "C" y "D" Pb(II) (80 y 160 ppm, respectivamente); Grupo "E" Cd(II) y Pb(II) (80 ppm c/u); Grupo "F" Cr(VI) (10 ppm); Grupo "G" Cr(VI) (20 ppm); Grupo "H" Cr(VI) (30 ppm) y los Grupos "I" y "J" como controles. Se tomaron muestras de las colonias aleatoriamente cada tres días para determinar Cd(II) y Pb(II) por un periodo de 21 días y para el Cr(VI) cada cuatro días por un periodo de 28 días.

### **Tratamiento de las muestras**

Las colonias de *Nostoc commune* seleccionadas aleatoriamente fueron secadas externamente con papel filtro; con una jeringa se extrajo 100  $\mu\text{L}$  de líquido interno y se trasladó a un microtubo de centrifuga, sometiéndolo a 8000 rpm durante 8 minutos.

Previo a la determinación de Cd(II) y Pb(II), los sobrenadantes fueron tratadas en un sistema de digestión por fotólisis UV con el fin de eliminar el material orgánico que contenían, para lo que en cada tubo de digestión se colocó 50 de muestra, 20 de peróxido de hidrógeno, 50 de ácido nítrico y 5,0 mL de agua ultrapura, tras una hora de digestión se traspasaron las muestras a una fiola de 10 mL enrasándose con agua ultrapura.

### **Determinación voltamperométrica de Cd(II) y Pb(II)**

Un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de muestra tratada y 10,0 mL de buffer fueron transferidos a la celda voltamperométrica, las concentraciones de Cd(II) y Pb(II) presentes fueron determinados por voltamperometría de redisolución anódica. Los parámetros voltamperométricos comprenden: potencial de deposición -0,9 V; tiempo de deposición 30 s; velocidad de barrido 30 mV/s; amplitud de pulso 0,05 V y tiempo de pulso 0,04 s. La curva corriente potencial fue registrada en el intervalo potencial de -0,2 a -0,8 V.

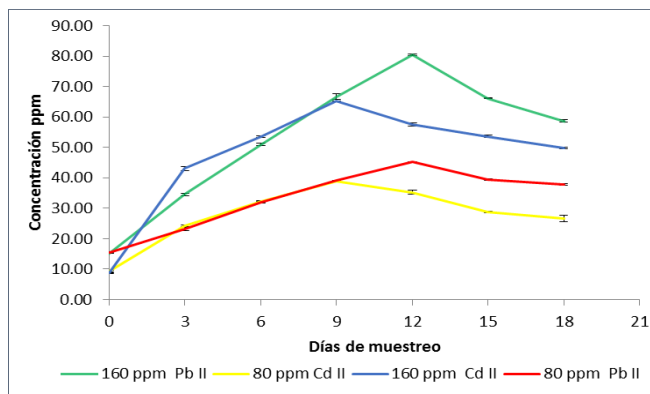
### **Determinación de Cr(VI) por espectrofotometría**

Para las muestras a las que se les determinó Cr(VI), una vez centrifugadas se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  y se la llevó a una fiola de 10 mL, añadiéndosele 1,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2 M y 200  $\mu\text{L}$  de solución de difenilcarbazida, y tras 2 minutos de reacción se procedió a leer en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En el presente trabajo se evaluó la capacidad acumuladora de Cd(II), Pb(II) y Cr(VI) de las colonias del *Nostoc commune* “murmunta”, las cuales fueron cultivadas en medio hidropónico. Antes de proceder a las lecturas, tanto voltamperométricas como espectrofotométricas, se procedió a validar ambos métodos.

Una vez que se contó con los métodos debidamente validados se determinó las concentraciones basales de Cd(II), Pb(II) y Cr(VI) en *Nostoc commune*, los resultados fueron 9,37, 15,30 y 0,32 ppm, respectivamente. Luego se contaminó el medio hidropónico con estos metales en las concentraciones ya descritas.



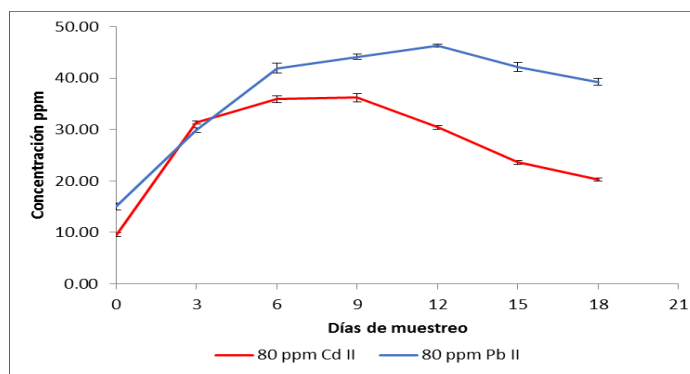
**Figura 1.** Efecto del tiempo de contacto en la acumulación de Cd(II) y Pb(II) por la “murmunta”, a temperatura ambiente (valores de desviación estándar mostrados en cada punto).

Como se observa en la figura 1 la mayor concentración de Pb(II) acumulado se logró en el depósito que contenía 160 ppm de Pb(II), alcanzando un valor de 80,40 ppm (50,35% de remoción, equivalente a 3589,9 mg de Pb(II)/kg de cianobacteria seca) en el 12<sup>avo</sup> día de análisis, al mismo día de análisis se logró la mayor absorción en el contenedor de 80 ppm de Pb(II) que corresponde a 45,20 ppm (56,5 % de remoción, equivalente a 2017,86 mg de Pb(II)/kg de cianobacteria seca), por lo que el 12<sup>avo</sup> día corresponde al día óptimo de máxima absorción de Pb(II) por la murmunta.

En el caso del Cd(II) el día óptimo de acumulación es el 9<sup>no</sup> alcanzándose valores de 38,90 ppm (48,6 % de remoción, 1736,61 mg/kg cianobacteria seca) y 65,10 ppm (40,7 % de remoción, 2906,25 mg/kg cianobacteria seca) para los contenedores de 80 y 160 ppm de Cd(II), respectivamente.

En comparación, los mayores porcentajes de acumulación se lograron en el contenedor de 80 ppm de Pb(II) mostrando así una mayor afinidad de la murmunta por el Pb(II) sobre el Cd(II).

Dado los resultados anteriores y para determinar si existía competencia entre los metales estudiados se contaminó un contenedor con ambos metales a 80 ppm de Cd(II) y 80 ppm de Pb(II).

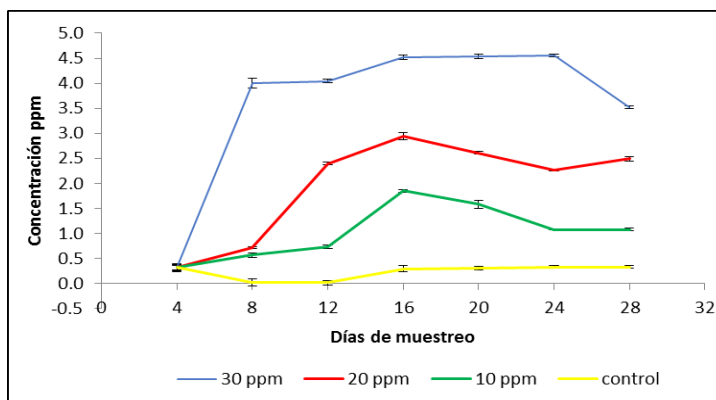


**Figura 2.** Efecto del tiempo de contacto de Cd(II) y Pb(II) en sistemas bimetálicos en la acumulación por la “murmunta” a temperatura ambiente (valores de desviación estándar mostrados en cada punto)

La figura 2 demuestra que no existe competencia para la acumulación de ambos metales en la murmunta siendo las máximas concentraciones (46,2 ppm de Pb(II) y 36,2 ppm de Cd(II)) similares a las de los contenedores que contenían un solo metal, mostrándose una vez más que el día 12<sup>avo</sup> de experimentación resulta el óptimo para Pb(II) y el día 9<sup>no</sup> para Cd(II).

En la figura 3 se observa los resultados obtenidos de los distintos días de muestreo para la determinación de Cr(VI), los depósitos fueron contaminados a 10, 20 y 30 ppm, como se observa fueron 7 puntos tomados cada 4 días haciendo un total de 28 días de experimentación.

Como se muestra existe una relación directa entre la concentración de Cr(VI) presente en el depósito y la concentración de Cr(VI) dentro de la murmunta, puesto que las murmuntas colocadas en el contenedor con 30 ppm de Cr(VI) mostraron la mayor acumulación del metal llegando en el 12<sup>avo</sup> día a captar 4,52 ppm de Cr(VI) (equivalente a 201,64 mg de Cr(VI) por kilogramo de cianobacteria seca, 15,07 % de remoción).



**Figura 2.** Acumulación de Cr(VI) por *Nostoc commune* no tratada, en sistema mono ion (temperatura ambiente, tiempo de contacto= 28 días, valores de desviación estándar mostrados en cada punto)



Posterior al 12<sup>avo</sup> día se observó una baja notoria de la concentración del metal en estudio, esto probablemente por un mecanismo de regeneración de la murmurta y que puede verse apoyado por el hecho de que al 28<sup>avo</sup> día de experimentación estas volvieron a mostrar un alza en la cantidad de Cr(VI) acumulado, notándose un mejor aspecto en las colonias restantes e incluso nuevas colonias.

Dado que al tomar el líquido interno de las cianobacterias para analizar las concentraciones captadas de Cd(II), Pb(II) y Cr(VI), se evidenció que a mayor concentración de metal colocada se produce una mayor acumulación dentro de la cianobacteria, se presume que el mecanismo de captación es de acumulación pasiva por gradiente de concentración.

En todos los contenedores contaminados con Cd(II), Pb(II) y Cr(VI) donde se colocaron las colonias de *Nostoc commune* se observó que cuando alcanzan su máxima concentración ya sea al noveno día en el caso del Cd(II), al duodécimo día en el Pb(II) o al duodécimo día para Cr(VI), estas concentraciones empiezan a disminuir en los siguientes días, por lo que se presume que una vez alcanzado su máximo nivel de acumulación para no morir ni intoxicarse por completo eliminan poco a poco pequeñas cantidades del metal que después se vuelven a absorber cuando ya están recuperadas y se encuentran en buen estado.

A pesar de no haberse reportado estudios con la misma especie (*Nostoc commune*), existen estudios <sup>8,9,10</sup> que demuestran la afinidad de otras especies de la misma familia *Nostocaceae* por el Pb(II) en los que este tipo de cianobacteria es centrifugada o secada y tamizada para obtener su biomasa, nuestro trabajo reporta la capacidad del *Nostoc commune* en su estado hidratado y sin alteraciones de ningún tipo, por lo que constituye una alternativa de biorremediación económica además de ecoamigable.

Se ha encontrado que las cianobacterias producen diversos tipos de exopolisacáridos (EPS), los que juegan un rol importante en la estabilización de las células secadas al aire, por lo que *Nostoc commune* puede resistir la desecación extrema y restaurar fácilmente su actividad metabólica después de la rehidratación<sup>11</sup>; asimismo, muchas veces estos EPS presentan sustituyentes como grupos acilo, aminoácidos o sulfatos en sus esqueletos<sup>12</sup> y dado que cargas negativas estarán presentes en EPS, las cianobacterias productoras de EPS como el *Nostoc commune* podrían considerarse como agentes quelantes para la eliminación de iones de metales pesados con carga positiva de soluciones acuosas.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que las colonias de *Nostoc commune* hidratadas y sin previo tratamiento son algas biorremediadoras debido a que acumulan y absorben Cd(II), Cr(VI) y Pb(II) del medio donde se encuentran, este estudio se llevó a cabo en sistemas *batch* mono y bimetálico, evidenciando mayor afinidad de la cianobacteria por el Pb(II) en comparación con el Cd(II) y Cr(VI) y no mostrando competición en sistemas bimetálicos de Cd(II) y Pb(II).

Asimismo, se observó una relación directa entre la concentración colocada por cada grupo y la concentración del analito dentro de la “murmunta”, hasta alcanzar un valor máximo para posteriormente iniciar un descenso corto y luego continuar su proceso de remoción de metales pesados, al parecer como un mecanismo de defensa propio, es así que la utilización de la especie *Nostoc commune* constituye una alternativa de biorremediación económica además de ecoamigable.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Delgadillo AE, González CA, Prieto F, Villagómez R, Acevedo O. Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. Trop Subtrop Agroecosyst. 2011; 14(2): 597 - 612.
2. Chung B. Control de los Contaminantes Químicos en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2008; 4(25): 413-418.
3. Torres Rodríguez D. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. Ecosistemas. [Internet] 2003, XII ( mayo-agosto ) : [Fecha de consulta: 03 de febrero de 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54012219>
4. Marrero Coto J, Amores Sánchez I, Coto Pérez O. Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. ICIDCA. 2012; 46(3): 52-61.
5. Azarpira H, Dhupal K, Pondhe G. Application of phycoremediation technology in the treatment of sewage water to reduce pollution load. Adv Environment Biol. 2014; 8(7): 2419-2423.
6. Ahmad F, Khan A, Yasar A. Comparative Phycoremediation of Sewage Water by Various Species of Algae. Proc Pakistan Acad Sci. 2013; 50(2): 131-139.
7. Ponce E. Nostoc: un alimento diferente y su presencia en la precordillera de Arica. IDESIA. 2014; 32(2): 115-118.
8. Nabanita C, Amita B, Ruma P. Accumulation of lead by free and immobilized cyanobacteria with special reference to accumulation factor and recovery. Bioresour Technol. 2011; 102(5): 4191-4195.
9. Grupta K, Rastogi A. Biosorption of lead (II) from aqueous solutions by non - living algal biomass *Oedogonium sp.* and *Nostoc sp.* - A comparative study. Colloids Surf B Biointerfaces. 2008; 64(2): 170-178.
10. Grupta VK, Rastogi A. Sorption and desorption studies of chromium(VI) from nonviable cyanobacterium *Nostoc muscorum* biomass. J Hazard Mat. 2008; 154(1-3): 347-354.
11. Wang Hong-Bin, Wu Sheng-Jun, Liu Dou. Preparation of polysaccharides from cyanobacteria *Nostoc commune* and their antioxidant activities. Carbohydr Polym. 2014; 99: 553–555.
12. Bhunia B, Prasad Uday US, Oinam G, Mondal A, Bandyopadhyay TK, Tiwari ON. Characterization, genetic regulation and production of cyanobacterial exopolysaccharides and its applicability for heavy metal removal. Carbohydr Polym. 2018;179:228-243.

## DESARROLLO DE ELECTRODOS DE BAJO COSTO BASADO EN ÓXIDOS METÁLICOS PARA LA GENERACIÓN DE CLORO

Daniel Bazán Arista<sup>a</sup>, Angélica María Baena Moncada<sup>a</sup>, Adolfo La Rosa-Toro Gómez<sup>a\*</sup>

### RESUMEN

Se prepararon electrodos de SnO<sub>2</sub> dopados con Sb soportados en láminas porosas de titanio mediante impregnación, sinterización y descomposición térmica de soluciones precursoras con diferentes porcentajes en masa de Sn y Sb (Sn:Sb = 9:1 y Sn:Sb = 7:3). Estos fueron recubiertos por una capa de β-PbO<sub>2</sub> obtenida por el método de electrodeposición anódica a una temperatura de 65 °C y una densidad de corriente 30 mA cm<sup>-2</sup>, durante 30 minutos. Los electrodos fueron caracterizados por espectroscopía Raman, microscopía electrónica de barrido y voltamperometría cíclica. Los resultados obtenidos mostraron que el recubrimiento con mayor contenido de estaño brinda las condiciones óptimas para la formación de la inter-capa entre el Ti y el PbO<sub>2</sub>, como la formación de una película homogénea, bajos sobrepotenciales para la reacción de evolución de cloro y estabilidad a pH neutro. La película de PbO<sub>2</sub> electro-sintetizada presentó estructura piramidal y de acuerdo al espectro Raman presenta la fase dominante de Plattnerite [β-PbO<sub>2</sub>], desarrolla bajos sobrepotenciales para la reacción de evolución de cloro con un tiempo de vida determinado por cronopotenciometría de 171,75 horas en electrólisis en NaCl al 6 % empleando una densidad de corriente de 30 mA cm<sup>-2</sup>.

**Palabras clave:** dióxido de estaño, dióxido de plomo, reacción de oxidación de cloro, tiempo de vida.

## DEVELOPMENT OF ANODIC ELECTRODES BASED ON LOW COST METAL OXIDES FOR THE GENERATION OF FREE CHLORINE

### ABSTRACT

SnO<sub>2</sub> electrodes doped with Sb were prepared, supported on porous titanium sheets by impregnation, sintering and thermal decomposition of precursor solutions with different mass percentages of Sn and Sb (Sn: Sb = 9:1 and Sn: Sb = 7:3). The electrodes were coated with a layer of β-PbO<sub>2</sub> obtained by anodic electrodeposition method at 65 °C and a current density of 30 mA cm<sup>-2</sup>, for 30 minutes. The electrodes were characterized by Raman spectroscopy,

---

<sup>a</sup> Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru s/n, Rimac, Lima 25, Perú toro@uni.edu.pe

scanning electron microscopy, and cyclic voltammetry. The results obtained showed that the catalyst with the highest content of Sn provides the optimal conditions for the inter-layer formation between Ti and  $\text{PbO}_2$ , such as the formation of a homogeneous film, low overpotentials for the chlorine evolution reaction and stability at neutral pH. The synthesized  $\text{PbO}_2$  film presented a pyramidal shape morphology, according to the Raman spectrum; it has the Plattnerite form [ $\beta$ - $\text{PbO}_2$ ]. In addition to low overpotentials for the chlorine evolution reaction, with a life time determined by Cronopotenciometric measurements of 171.75 hours in NaCl at 6% and with a current density of  $30 \text{ mA cm}^{-2}$ .

**Key words:** tin dioxide, lead dioxide, chlorine oxidation reaction, lifetime

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la producción electroquímica mundial de cloro es un proceso que consume grandes cantidades de energía y emplea electrodos basados en metales nobles, por lo que es necesario optimizar el proceso empleando electrodos de bajo costo y de buena eficiencia anódica. Los anodos dimensionalmente estables son electrodos que se emplean para la producción industrial de cloro<sup>1</sup>. Los electrodos de  $\text{Ti/SnO}_2\text{-Sb}_2\text{O}_3$  son uno de los materiales más prometedores para ser empleados en el proceso de oxidación electroquímica, estos materiales presentan altos sobrepotenciales para la reacción de evolución de oxígeno, comportamiento que se encuentra asociado a la generación de radicales hidroxilo; la elevada eficiencia obtenida se le atribuye a la buena conductividad del componente de óxido de antimonio; además de tener bajo costo y baja toxicidad. Sin embargo, presentan la desventaja de tener un tiempo de vida muy corto<sup>1-3</sup>. En este contexto, el material del ánodo juega un papel crítico, porque este deberá ser inocuo, de bajo costo y deberá tener un tiempo de vida útil.

El óxido de plomo existe en dos estados de oxidación,  $\text{Pb}^{4+}$  ( $\text{PbO}_2$ ) y  $\text{Pb}^{2+}$  ( $\text{PbO}$ ), toma dos formas cristalinas, tetragonal ( $\beta$ - $\text{PbO}_2$ ,  $\alpha$ - $\text{PbO}$ ) y ortorrómbico ( $\beta$ - $\text{PbO}_2$ ,  $\alpha$ - $\text{PbO}$ )<sup>4,5</sup>. El óxido de plomo ha sido usado como material anódico, es de bajo costo, estable y fácil de preparar, además posee altos sobrepotenciales para la reacción de evolución de oxígeno<sup>6</sup>. Muchos investigadores han hecho un gran esfuerzo por aumentar el desempeño de los electrodos de  $\text{PbO}_2$ , como la adición de una capa interna ( $\text{SnO}_2\text{-Sb}$ ) entre el titanio y el  $\text{PbO}_2$ , o la incorporación de un dopante metálico o no metálico<sup>7,8</sup>. Otros estudios han demostrado que el uso de un sustrato de Ti poroso tiene un papel importante en el desempeño del  $\text{PbO}_2$ <sup>9</sup>.

En este trabajo se utilizó el método de descomposición térmica como método de síntesis para obtener los óxidos de estaño dopados con antimonio sobre las placas de Ti porosas, donde se probó dos proporciones diferentes de Sn:Sb 9:1 y Sn:Sb 7:3, siendo más estable el electrodo con mayor porcentaje de Sn; posteriormente, se electrodepositó una película de  $\beta$ - $\text{PbO}_2$  sobre la superficie de  $\text{SnO}_2\text{-Sb}_2\text{O}_3$ . Los óxidos depositados fueron evaluados frente a la reacción de evolución de cloro por voltamperometría cíclica, y el tiempo de vida útil a pH neutro por cronopotenciometría.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Preparación de electrodos de $\text{Ti/SnO}_2\text{-Sb}_2\text{O}_3/\text{PbO}_2$ ( $\text{EA-Sn}_x\text{Sb}_y/\text{Pb}$ )

Como soporte se utilizó titanio poroso (99,99 %, Goodfellow) (tamaño: 40 mm x 5 mm x 0,5 mm). Las láminas de titanio fueron tratadas con ácido oxálico al 10 % ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 99,9 %, J.T.BAKER) en ebullición, y se lavó con agua ultrapura (Sistema MILLIPORE Q MILLI PLUS,  $18,2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). La capa interna de  $\text{SnO}_2\text{-Sb}_2\text{O}_3$  fue depositada por descomposición térmica sobre el titanio poroso  $\text{Ti/SnO}_2\text{-Sb}_2\text{O}_3$ , denotado como  $\text{TD-Sn}_x\text{Sb}_y$ , partiendo de una solución de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (98-101 %, Fermont),  $\text{SbCl}_3$  (>99 %, Merck) y  $\text{HCl}$  concentrado (36-37 %, Merck), se utilizó como solvente etanol (89-91 %, Fermont)<sup>10,11</sup>. Los porcentajes nominales de los precursores fueron (en moles)  $\text{DT-Sn}_9\text{Sb}_1$  ( $\text{Sn}:\text{Sb}=9:1$ ) y  $\text{DT-Sn}_6\text{Sb}_4$  ( $\text{Sn}:\text{Sb}=6:4$ ). El electrodo poroso de titanio fue impregnado con la solución precursora utilizando un pincel, con posterior secado a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  por un periodo de 5 min. Luego se realizó un tratamiento térmico a  $400 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 min en presencia de oxígeno. El proceso se repitió 30 veces hasta alcanzar una carga másica entre  $1.1\text{-}1.6 \text{ mg cm}^{-2}$ . Al alcanzar la carga másica deseada se realizó un tratamiento final a  $500 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 h<sup>10</sup>. Finalmente se obtuvo como producto una capa intermedia de  $\text{SnO}_2\text{-Sb}_2\text{O}_3$ .

Una vez obtenidos los electrodos de  $\text{DT-Sn}_x\text{Sb}_y$ , se procedió a electrodepositar una capa de  $\beta\text{-PbO}_2$  para obtener electrodos del tipo  $\text{Ti/SnO}_2\text{-Sb}_2\text{O}_3/\text{PbO}_2$  ( $\text{EA-Sn}_9\text{Sb}_1/\text{Pb}_{65}$ ). Para el depósito de la película de  $\text{PbO}_2$  sobre los electrodos de  $\text{DT-Sn}_x\text{Sb}_y$  se utilizó un área efectiva de  $1 \text{ cm}^2$ , el depósito se hizo en modo galvanostático en una celda electrolítica de un solo compartimento<sup>12</sup>, utilizando como cátodo acero inoxidable, con una separación entre electrodos de 1 cm. La solución electrolítica empleada fue  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (>99,0 %, ACS reagent SIGMA-ALDRICH) y el pH se ajustó a 1 con  $\text{HNO}_3$  (62-63%, pro analysis)<sup>12</sup>. Se realizó un estudio del proceso de electrodeposición variando las densidades de corriente desde 5 hasta  $30 \text{ mA cm}^{-2}$ , también se estudió el depósito a diferentes velocidades de agitación desde 0 a 450 rpm y dos temperaturas distintas 25 y  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ <sup>11</sup>. Los electrodos obtenidos fueron lavados con agua desionizadas y secados en estufa<sup>13</sup>.

### Caracterización fisicoquímica

Para estudiar la morfología y hacer un análisis elemental se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM, JEOL, JSM-6390A) equipado con un analizador de dispersión de rayos x (EDX). Las medidas de dispersión Raman fueron obtenidas con un espectrómetro HORIBA Scientific, utilizando un laser de Ar a una longitud de onda de 632 nm.

### Caracterización electroquímica

Los experimentos electroquímicos fueron llevados a cabo en una celda de electroquímica de tres electrodos, usando un electrodo de referencia de  $\text{Ag/AgCl}$  y grafito como electrodo auxiliar. En este estudio el electrodo de trabajo consistió en un electrodo de Ti modificado ( $\text{DT-Sn}_x\text{Sb}_y$ ,  $\text{EA-Sn}_9\text{Sb}_1/\text{Pb}_{65}$ ). Las medidas electroquímicas fueron realizadas con un potenciostato-galvanostato Ivium STAT en electrolito previamente burbujeado con nitrógeno para desplazar el oxígeno disuelto. En este trabajo todos los potenciales son reportados versus el electrodo de referencia  $\text{Ag/AgCl}$  ( $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ ).  $\text{NaNO}_3$   $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  (99,5 %, MERCK)

fue usado como electrolito soporte. Se realizaron voltamperometrías cíclicas y se hicieron adiciones de NaCl para observar el comportamiento del electrodo frente a la generación de cloro. NaCl fue adicionado al electrolito soporte para obtener una concentración final de 0, 1000, 5000 y 10000 ppm.

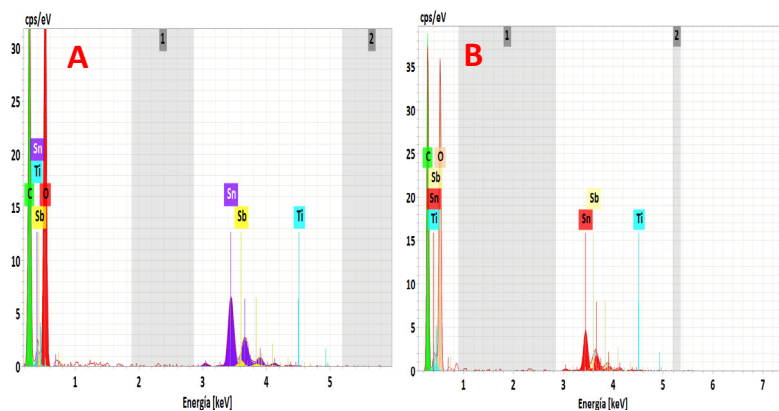
### **Evaluación de la estabilidad anódica de los electrodos (tiempo de vida)**

La estabilidad anódica frente la evolución de cloro fue evaluada mediante cronopotenciometría en 2000 mL de NaCl 6% w/v, las medidas fueron realizadas a pH 7 usando un potenciómetro S/M PL-700PV, el área expuesta de los electrodos fue de 1 cm<sup>2</sup> y se impuso una corriente constante de 150 mA.cm<sup>-2</sup> para todos los electrodos a 25 °C. El análisis por cronopotenciometría fue utilizado para registrar el incremento de potencial de los electrodos y se utilizó un Datalogging Hantek 365A, con electrodo de referencia de Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Síntesis y caracterización de los electrodos DT- Sn<sub>x</sub>Sb<sub>y</sub>**

Una lámina de titanio porosa fue utilizada como sustrato, primero se desengrasó con acetona sumergiéndolo durante 10 min, posteriormente se atacó químicamente con ácido oxálico al 10 % w/t durante una hora en ebullición. El tratamiento produjo una superficie rugosa de color gris apropiada para el anclaje de los óxidos. Para obtener los óxidos metálicos se empleó sales precursoras de SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y SbCl<sub>3</sub> en una relación de Sn/Sb 6:4 y Sn/Sb 9:1 en masa, las cuales fueron disueltas en etanol, HCl fue adicionado para asegurar la completa disolución de las sales. Las soluciones precursoras fueron impregnadas en el sustrato poroso de titanio mediante pintado, mojando bien la superficie sin dejar excesos, seguido de un secado a 80 °C durante 5 minutos para eliminar el solvente y posterior tratamiento térmico a 400 °C entre capa y capa, con un tratamiento final a 500 °C durante una hora con el propósito de obtener la sinterización de los óxidos. El análisis de EDX mostró que las composiciones en masa de los óxidos obtenidos eran Sn/Sb 9:1 para el primer electrodo y Sn/Sb 7:3 para el segundo electrodo (tabla 1). En la figura 1 se puede observar las imágenes SEM de los electrodos sintetizados, para el electrodo de DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub> (figura 2 A y B) se observa una película homogénea y de mejor calidad que el obtenido con el electrodo DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub> (figura 1 C y D), donde se observa huecos y fragmentos grandes dentro de la película.

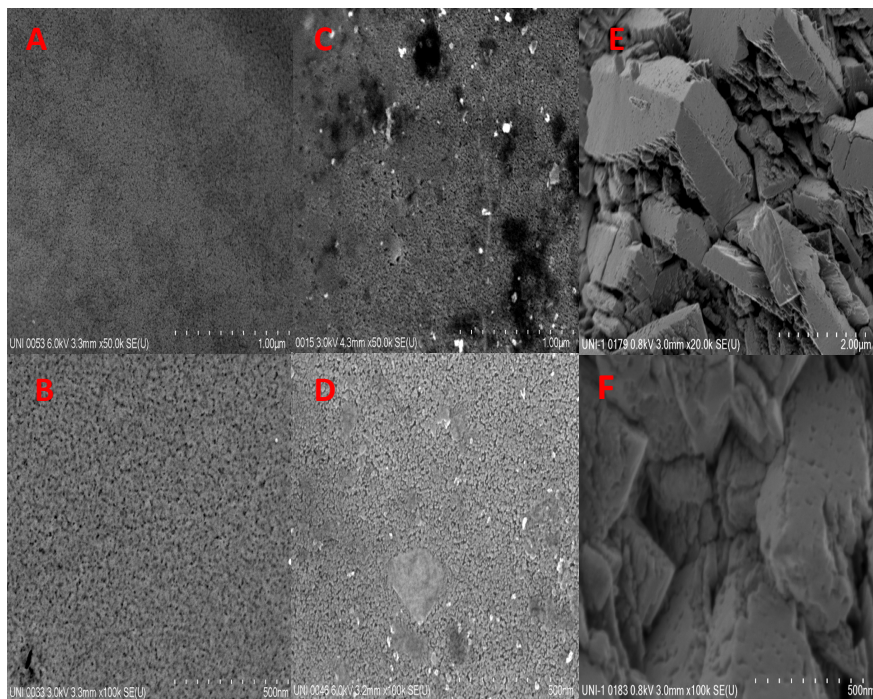


**Figura 1.** Imagen EDX para los catalizadores DT-Sn<sub>x</sub>Sb<sub>y</sub>. A) Catalizador DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>, B) Catalizador DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub>

**tabla 1.** Porcentaje en masa obtenido por análisis EDX para los electrodos DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub> y DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub>

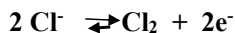
Electrodo	DT-Sn <sub>9</sub> Sb <sub>1</sub>	DT-Sn <sub>7</sub> Sb <sub>3</sub>
Elemento	Porcentaje en masa / %	Porcentaje en masa / %
Sb	6,87	21,42
O	27,12	22,76
Ti	4,60	7,80
Sn	61,40	48,02
Proporción en masa Sn:Sb	90:10	69:31
Proporción en masa Sn:Sb	90:10	60:40

nominal



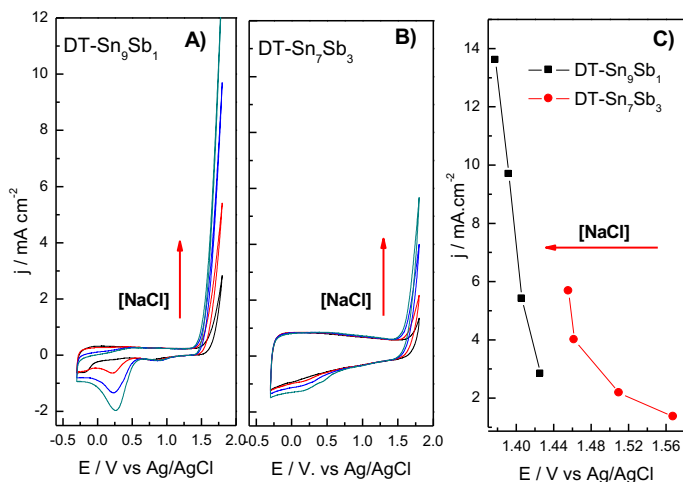
**Figura 2.** Imagen SEM de los catalizadores sintetizados. A y B corresponden al catalizador DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>, C y D al catalizador DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub>. E y F al catalizador EA-Sn<sub>10</sub>Sb<sub>1</sub>/Pb<sub>65</sub>

Las voltamperometrías cíclicas en NaNO<sub>3</sub> 0.2 mol L<sup>-1</sup>, de ambos electrodos, se muestran en la figura 3, se puede observar que el potencial de inicio para la reacción de evolución de oxígeno (REO) son 1,43 V y 1,56 V para DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub> y DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub>, respectivamente. Para observar la actividad catalítica para la reacción de evolución de Cl<sub>2</sub> de acuerdo con:



Se realizaron adiciones de NaCl, se puede apreciar en la figura 2 A) y B) un aumento de corriente, a medida que aumenta la concentración de NaCl, a menores concentraciones de NaCl el sobrepotencial para la REO es mayor, indicando una mayor inhibición para la oxidación de oxígeno<sup>3</sup>. También se observa una disminución en el potencial de inicio de la oxidación cuando se agregan 1000 ppm NaCl de 0,01 y 0,05 V para DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub> y DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub>, respectivamente, este comportamiento puede ser atribuido al hecho de que la corriente de oxidación corresponde no solo a la formación de oxígeno, involucrando también a la evolución de cloro, ambos procesos ocurren de forma simultánea y en competencia. En la figura 3C se puede apreciar un gráfico de la densidad de corriente versus en potencial de inicio de la oxidación, en donde se puede observar que el electrodo DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>, presenta menores sobrepotenciales para la reacción de evolución de cloro y densidades de corriente de pico más altas que el electrodo DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub>.

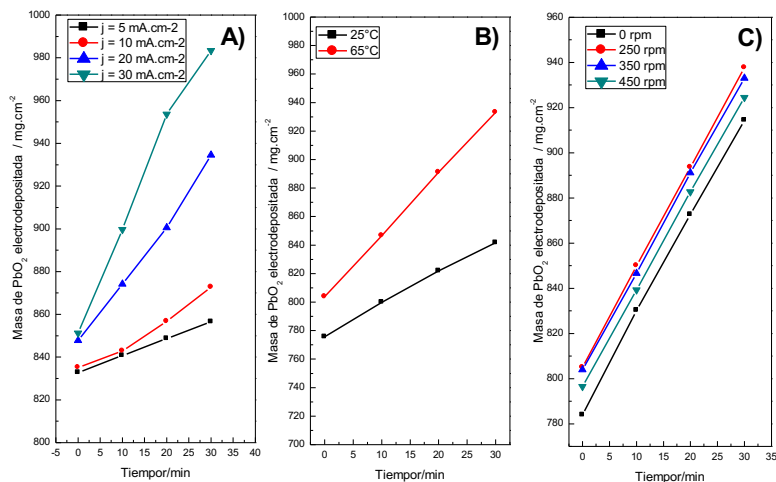




**Figura 3.** Voltamperométrías cíclicas en  $\text{NaNO}_3$  0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  para los electrodos DT-Sn<sub>x</sub>Sb<sub>y</sub>. Línea negra 0 ppm NaCl, Línea roja 1000 ppm NaCl, Línea azul 5000 ppm NaCl, Línea verde 10000 ppm NaCl. A). DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>, B) DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub>, C) Grafico de la densidad de corriente versus el inicio de la oxidación,  $v$ : 50  $\text{mV s}^{-1}$ .

### Síntesis y caracterización del electrodo EA-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>/Pb<sub>65</sub>.

La electrodeposición de  $\text{PbO}_2$  sobre los electrodos de DT-Sn<sub>x</sub>Sb<sub>y</sub> se realizó en una celda electrolítica usando dos láminas de acero como cátodo. El ánodo (DT-Sn<sub>x</sub>Sb<sub>y</sub>) se colocó entre las dos láminas durante el proceso de deposición anódica. De acuerdo a los resultados obtenidos durante la caracterización morfológica y electroquímica de los electrodos DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub> y DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub>, se observó que el electrodo de DT-Sn<sub>10</sub>Sb<sub>1</sub> mostró un mejor cubrimiento de la película de  $\text{PbO}_2$  depositada, buena adhesión al sustrato y excelente cubrimiento superficial, además de menores sobrepotenciales para la reacción de evolución de cloro. Por estas razones se eligió el electrodo DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub> para la electrodeposición del  $\text{PbO}_2$ . La formulación de la solución electrolítica de  $\text{Pb}^{2+}$  genera una película de  $\text{PbO}_2$  de buena calidad a 25 °C. La deposición del film de  $\text{PbO}_2$  inicialmente se realizó a 25 °C, 300 rpm y se varió la densidad de corriente con la finalidad de evaluar las condiciones óptimas para obtener una buena cobertura del sustrato, se usaron densidades de 5, 10, 20 y 30  $\text{mA cm}^{-2}$ . En la figura 4 se observa que la cantidad de masa electrodepositada es proporcional a la corriente aplicada, como consecuencia se obtiene una línea recta.



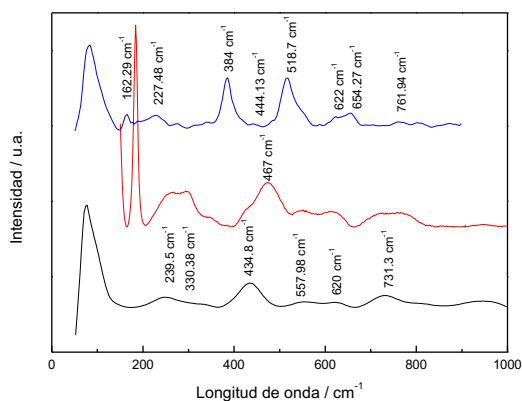
**Figura 4.** Gráfico de la masa de PbO<sub>2</sub> electrodepositada vs. El tiempo de electrodeposición en 0,5 mol L<sup>-1</sup> Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, pH 1. **A).** Condiciones de electrolisis: T = 25 °C, t = 120 min, 300 rpm, j = 5, 10, 20 y 30 mA cm<sup>-2</sup>. **B).** Condiciones de electrolisis: j = 30 mA cm<sup>-2</sup>, t = 30 min, v = 300 rpm, T = 25 °C and 65 °C. **C).** Condiciones de electrolisis: j = 30 mA cm<sup>-2</sup>, T = 65 °C, t = 30 min, v = 0, 250, 300 and 450 rpm.

De acuerdo a los test preliminares, la velocidad de masa de PbO<sub>2</sub> electrodepositada no depende de la velocidad de agitación de la solución electrolítica (figura 4C), la masa de PbO<sub>2</sub> se mantiene casi constante para todas las velocidades probadas. La cantidad de PbO<sub>2</sub> depende de la densidad de corriente aplicada, además, la morfología de la película de PbO<sub>2</sub> depende de la densidad de corriente, de la concentración de Pb (II) y la temperatura de la solución electrolítica<sup>11</sup>.

El tiempo de electrolisis no afecta la capa activa de PbO<sub>2</sub>, y se mantiene la forma típica piramidal reportada por otros autores<sup>14</sup> pero tiene un pequeño efecto sobre el tipo de cristal, pero no influencia la estructura o el tamaño del cristal. Un buen cubrimiento superficial del sustrato se alcanza después de 10 minutos. Se eligió un periodo de 30 minutos para la electrodeposición del PbO<sub>2</sub><sup>11</sup>. De esta forma se garantiza la cobertura del sustrato y se obtiene un electrodo de PbO<sub>2</sub> poroso. Otros autores emplearon tiempos de 60 a 120 minutos de electrolisis conllevando a conseguir un mayor espesor, factor que puede incidir en un mayor tiempo de vida útil<sup>13,15</sup>.

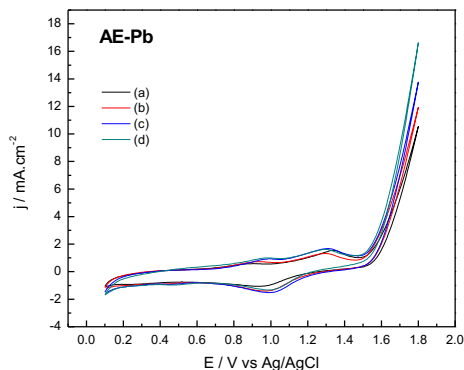
La masa de PbO<sub>2</sub> obtenida a 25 °C fue de 841,51 mg cm<sup>-2</sup>, mientras que a 65 °C se obtuvo una masa de 934,32 mg cm<sup>-2</sup> de PbO<sub>2</sub>. Según la literatura a 25 °C la película obtenida está compuesta de partículas casi esféricas poco homogéneas, por encima de los 45 °C la película obtenida se basa en cristales con forma piramidal. La literatura considera la temperatura de 65 °C como la temperatura óptima para la electrodeposición<sup>11</sup>.

En la figura 5 se observa el espectro Raman para los electrodos DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub> y el electrodo EA-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>-Pb<sub>65</sub>. El espectro del DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub> muestra tres picos a 439,32, 668,53 y 744,93 cm<sup>-1</sup>, estos picos están relacionados con la estructura tipo rutilo del SnO<sub>2</sub>, existe un corrimiento a bajas longitudes de onda debido, probablemente, al reemplazo de iones Sn<sup>2+</sup> por iones Sb<sup>2+</sup> en la red cristalina<sup>16</sup>. El espectro Raman del catalizador DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub> presenta dos picos adicionales en comparación con el DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>, un pico a 184 cm<sup>-1</sup> y a 467 cm<sup>-1</sup>, estos picos son debidos al aumento de la concentración de antimonio en la síntesis de este óxido metálico y podría ser asignado a la forma Senarmontite (Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> cúbica)<sup>17</sup>. En el electrodo EA-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>/Pb<sub>65</sub> se observan tres picos adicionales a 425,85, 510,84 y 653,87 cm<sup>-1</sup> asignados a la forma Plattnerite [β-PbO<sub>2</sub>]<sup>18</sup>.



**Figura 5.** Espectro Raman de los catalizadores DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>, línea negra. DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub>, línea roja y EA-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>/Pb<sub>65</sub>.

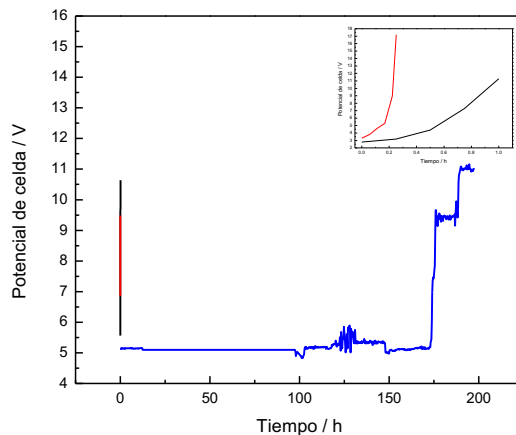
Se realizaron experimentos de voltamperometría cíclica del electrodo AE-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>/Pb<sub>65</sub> para observar la estabilidad y el aumento de actividad frente a la producción de cloro en comparación con el electrodo TD-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>. El estudio se realizó utilizando NaNO<sub>3</sub> como electrolito soporte y con adiciones de diferentes cantidades de NaCl. En la figura 6 se observa la respuesta electroquímica para el electrodo EA-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>/Pb, se produce un corrimiento a potenciales negativos, y la corriente de pico se incrementa cuando se aumenta la concentración de NaCl. Sin embargo, el potencial de inicio para la oxidación se mantiene igual que el obtenido con el electrodo TD-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub> como se observa en la figura 3. Se puede apreciar un incremento de corriente para la evolución de cloro en el electrodo EA-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>/Pb<sub>65</sub> de 16,51 μA, en comparación con el valor obtenido en electrodo de TD-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub> (13,54 μA).



**Figura 6.** Voltamperometría cíclica en  $\text{NaNO}_3$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  del electrodo  $\text{EA-Sn}_9\text{Sb}_1/\text{Pb}_{65}$ . (a) 0 ppm NaCl. (b) 1000 ppm NaCl. (c) 5000 ppm NaCl. (d) 10000 ppm NaCl.  $v$ :  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

### Estabilidad electroquímica

Es importante conocer la estabilidad de los electrodos sintetizados para la evolución de cloro a pH 7. La estabilidad electroquímica fue evaluada en NaCl 6 %, pH 7; a una corriente constante de  $150 \text{ mA cm}^{-2}$ , los experimentos de tiempo de vida acelerada se realizaron por cronopotenciometría. En la figura 7 se puede observar la cronopotenciometría de los electrodos sintetizados, la desactivación se alcanza después de 1 y 0,25 horas para  $\text{DT-Sn}_9\text{Sb}_1$  y  $\text{DT-Sn}_7\text{Sb}_3$ , respectivamente. Estos electrodos no son adecuados para trabajar por periodos prolongados de tiempo, dado que no son estables en estas condiciones de operación, indicando que no es posible utilizarlos para la reacción de evolución de cloro. Se eligió trabajar con el electrodo  $\text{DT-Sn}_9\text{Sb}_1$  como soporte para la electrodeposición de la película de  $\text{PbO}_2$ , debido a que es más estable que el  $\text{DT-Sn}_7\text{Sb}_3$  a  $\text{pH} = 7$ . El electrodo  $\text{EA-Sn}_9\text{Sb}_1/\text{Pb}_{65}$  muestra un potencial constante a pH 7 durante 171,75 horas, después de este periodo hay un incremento significativo de voltaje desde 5,15 a 9,42 V, indicando la desactivación del electrodo. Resultados similares se han obtenido con electrodos de  $\text{Ti/Sb-SnO}_2/\text{Pb}_3\text{O}_4$  con un tiempo de vida de 180 horas en NaCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  <sup>19</sup>. Con base en estos resultados es posible la aplicación del electrodo de  $\text{EA-Sn}_9\text{Sb}_1/\text{Pb}_{65}$ , para la obtención de cloro en condiciones de pH neutro.



**Figura 7.** Tiempo de vida en 6 % NaCl de los electrodos DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub> línea negra, DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub> línea roja y EA-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>/Pb<sub>65</sub> línea azul, a corriente constante de 500 mAcm<sup>-2</sup>. Inserto: Ampliación de los electrodos DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub> línea negra, DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub> línea roja.

## CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se evaluaron dos proporciones de Sn:Sb para determinar la relación adecuada para la formación de la película que servirá como intercapa entre el titanio y el óxido de plomo. Los resultados mostraron que el electrodo de DT-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub> presentó las mejores características: Formación de una película homogénea, bajos sobrepotenciales para la reacción de evolución de cloro, y mayores densidades de corriente de pico en comparación al electrodo DT-Sn<sub>7</sub>Sb<sub>3</sub>, permitiendo su empleo como sustrato para la electrodeposición del PbO<sub>2</sub>. La electrodeposición de PbO<sub>2</sub> se realizó a 30 mA cm<sup>-2</sup>, 65 °C, 300 rpm, se obtuvo una película con una forma típica piramidal, por espectroscopía Raman se determinó la fase de Plattnerite [ $\beta$ -PbO<sub>2</sub>]. Los tres electrodos sintetizados son activos para la reacción de evolución de cloro, sin embargo, los electrodos de DT-Sn<sub>x</sub>Sb<sub>y</sub> no presentaron tiempos de vida adecuados para su utilización, mientras que, el electrodo EA-Sn<sub>9</sub>Sb<sub>1</sub>/Pb<sub>65</sub> muestra un potencial constante a pH 7 durante 171,75 horas, siendo una buena propuesta como catalizador para reacción de evolución de cloro.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el soporte económico brindado por Cienciaactiva bajo el convenio FONDECYT 209-2015 y el apoyo del Dr. Clemente Luyo en los análisis de caracterización SEM y EDX.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zeradjanin AR, La Mantia F, Masa J, Schuhmann W. Utilization of the catalyst layer of dimensionally stable anodes—Interplay of morphology and active surface area. *Electrochim Acta*. 2012;82:408–14.
2. Comninellis C. Electrocatalysis in the electrochemical conversion/combustion of organic pollutants for waste water treatment. *Electrochim Acta*. 1994;39(11–12):1857–62.
3. Shao D, Li X, Xu H, Yan W. An improved stable Ti/Sb–SnO<sub>2</sub> electrode with high performance in electrochemical oxidation processes. *RSC Adv*. 2014;4(41):21230–7.
4. D’Antonio P, Santoro A. Powder neutron diffraction study of chemically prepared β-lead dioxide. *Acta Crystallogr Sect B*. 1980;36(10):2394–7.
5. Filatov S, Bendeliani N, Albert B, Kopf J, Dyuzeva T, Lityagina L. High-pressure synthesis of α-PbO<sub>2</sub> and its crystal structure at 293, 203, and 113 K from single crystal diffraction data. *Solid state Sci*. 2005;7(11):1363–8.
6. Zhou M, Dai Q, Lei L, Ma C, Wang D. Long life modified lead dioxide anode for organic wastewater treatment: electrochemical characteristics and degradation mechanism. *Environ Sci Technol*. 2005;39(1):363–70.
7. Ding H, Feng Y, Liu J. Preparation and properties of Ti/SnO<sub>2</sub>–Sb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> electrodes by electrodeposition. *Mater Lett*. 2007;61(27):4920–3.
8. Ye Z-G, Meng H-M, Sun D-B. Electrochemical impedance spectroscopic (EIS) investigation of the oxygen evolution reaction mechanism of Ti/IrO<sub>2</sub><sup>+</sup> MnO<sub>2</sub> electrodes in 0.5 m H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution. *J Electroanal Chem*. 2008;621(1):49–54.
9. Braga NA, Cairo CAA, Almeida EC, Baldan MR, Ferreiraa NG. From micro to nanocrystalline transition in the diamond formation on porous pure titanium. *Diam Relat Mater*. 2008;17(11):1891–6.
10. Qiao Q, Wang L, Shi J, Jin J, Li Y. Properties of Fluoride-Doped β-PbO<sub>2</sub> Electrodes and their Electrocatalytic Activities in Degradation of Acid Orange II. *Int J Electrochem Sci*. 2015;10:10639–50.
11. Zhao W, Xing J, Chen D, Jin D, Shen J. Electrochemical degradation of Musk ketone in aqueous solutions using a novel porous Ti/SnO<sub>2</sub>-Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PbO<sub>2</sub> electrodes. *J Electroanal Chem*. 2016;775:179–88.
12. Zhang W, Kong H, Lin H, Lu H, Huang W, Yin J, et al. Fabrication, characterization and electrocatalytic application of a lead dioxide electrode with porous titanium substrate. *J Alloys Compd*. 2015;650:705–11.
13. Li X, Xu H, Yan W. Fabrication and characterization of PbO<sub>2</sub> electrode modified with polyvinylidene fluoride (PVDF). *Appl Surf Sci*. 2016;389:278–86.
14. Hao X, Quansheng Y, Dan S, Honghui Y, Jidong L, Jiangtao F, et al. Fabrication and characterization of PbO<sub>2</sub> electrode modified with [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> and its application on electrochemical degradation of alkali lignin. *J Hazard Mater*. 2015;286:509–16.
15. Shen Y, Li F, Li S, Liu D, Fan L, Zhang Y. Electrochemically enhanced photocatalytic degradation of organic pollutant on β-PbO<sub>2</sub>-TNT/Ti/TNT bifunctional electrode. *Int J Electrochem Sci*. 2012;7:8702–12.

16. Müller V, Rasp M, Štefanić G, Ba J, Günther S, Rathousky J, et al. Highly Conducting Nanosized Monodispersed Antimony-Doped Tin Oxide Particles Synthesized via Nonaqueous Sol–Gel Procedure. *Chem Mater.* 2009;21(21):5229–36.
17. Cody CA, DiCarlo L, Darlington RK. Vibrational and thermal study of antimony oxides. *Inorg Chem.* 1979;18(6):1572–6.
18. Burgio L, Clark RJH, Firth S. Raman spectroscopy as a means for the identification of plattnerite ( $\text{PbO}_2$ ), of lead pigments and of their degradation products. *Analyst.* 2001;126(2):222–7.
19. Shao D, Yan W, Cao L, Li X, Xu H. High-performance  $\text{Ti/Sb-SnO}_2/\text{Pb}_3\text{O}_4$  electrodes for chlorine evolution: Preparation and characteristics. *J Hazard Mater.* 2014;267:238–44.

## INFORMACIONES

### CONGRESO IBEROAMERICANO DE QUÍMICA XXIX CONGRESO PERUANO DE QUÍMICA Del 16 al 19 de octubre del 2018

#### MESAS REDONDAS

#### **Mesa Redonda I: “Avances tecnológicos en minería, hidrocarburos y energía en el Perú”**

Día : Martes 16 de octubre

Horas : 14:30 – 16:30

#### **Objetivos:**

- Conocer los avances tecnológicos implementados en el Perú en las industrias de minería, petróleo, energía y cemento.
- Conocer los retos en innovación y competitividad que deben asumir las industrias minero-energéticas y de cemento, para crear valor y sostenibilidad, haciendo uso de la tecnología.

#### **Mesa Redonda II: “La Química en nuestra gastronomía”**

Día : Miércoles 17 de octubre

Horas : 14:30 – 16:30

#### **Objetivos:**

- Conocer los mecanismos físico-químicos que se producen a nivel molecular en el arte culinario.
- Conocer la relación directa entre la gastronomía y la química de los alimentos y bebidas.
- Difundir las aplicaciones de la cocina molecular en la gastronomía peruana.



### **Mesa Redonda III: “Innovaciones en la industria textil, cosmética, pinturas y adhesivos”**

Día : Jueves 18 de octubre

Horas : 14:30 – 16:30

#### **Objetivos:**

- Conocer las innovaciones implementadas en el Perú en la industria textil, cosmética, pinturas y adhesivos.
- Conocer los retos en innovación y competitividad que deben asumir la industria textil, cosmética, pinturas y adhesivos para crear valor y sostenibilidad, haciendo uso de la tecnología.

# **SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**

## **SOCIOS HONORARIOS**

Dr. Mario J. Molina (México)  
Dra. Olga Lock Sing (Perú)  
Dr. Antonio Monge Vega (España)  
Dr. Lothar Beyer (Alemania)

## **SOCIOS CORRESPONDIENTES**

Dr. Aiache, Jean-Marc (Francia)  
Dr. Cea Olivares, Raymundo (México)  
Dr. Chifa, Carlos (Argentina)  
Dra. Cascales Angosto, María (España)  
Dr. Del Castillo García, Benito (España)  
Dr. De Simone, Francesco (Italia)  
Dr. García-Herbosa, Gabriel (España)  
Dr. Infante, Gabriel A. (Puerto Rico)  
Dr. Joseph-Nathan, Pedro (México)  
Dr. Mors, Walter B. (Brasil)  
Dr. San Feliciano, Arturo (España)  
Dr. Suwalski, Mario (Chile)  
Dr. Vicente Pérez, Santiago (España)



**CONGRESO IBEROAMERICANO DE QUÍMICA  
XIX CONGRESO PERUANO  
LIMA - PERÚ  
Del 16 al 19 de Octubre 2018**