

ISSN 1810-634X

# REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 83 N° 4

OCTUBRE - DICIEMBRE - 2017



INSTITUCIÓN CIENTÍFICA FUNDADA EN 1933

LIMA, PERÚ

**SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**  
**CONSEJO DIRECTIVO**  
**(marzo 2017 – marzo 2019)**

<b>Presidente</b>	: M.Sc. Graciela Silvia Untiveros Bermúdez
<b>Vice-Presidente</b>	: Dra. Ana María Muñoz Jáuregui
<b>Secretario General</b>	: Mg. Helmer Helí Lezama Vigo
<b>Past Presidente</b>	: Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre
<b>Tesorero</b>	: Dr. Juan Manuel Parreño Tipián
<b>Secretario del Consejo Directivo</b>	: Mg. Christian Israel Simión Siu
<b>Director de Biblioteca</b>	: Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
<b>Director Administrativo</b>	: Mg. Neptalí Ale Borja
<b>Vocales</b>	: Dra. Yadira Fernández Jerí
	: Ing. Richard Hernández Morán
	: M.Sc. Christian Jacinto Hernández
	: Mg. Lía Elis Concepción Gamarra
	: Lic. Norma Cuizano Vargas
	: Q. F. Mario Antonio Bolarte Arteaga
	: Ing. Quím. Hernán Zapata Gamarra
	: Ing. Quím. Raúl Martínez Ragas

**Comisión de Economía y Finanzas**

Presidenta: Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo

**Comisión de Publicaciones**

Presidenta: Dra. Ana María Muñoz Jáuregui

**Comisión de Actuaciones Científicas**

Presidenta: Ing. Quím. 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**

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

**Comité Consultivo**

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

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

**Revista indizada en el Chemical Abstracts, SciELO y Latindex**

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

Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú

Teléfono (511) 472-3925

e-mail: [sqperu@gmail.com](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 83**

**OCTUBRE - DICIEMBRE 2017**

**N° 4**

En el Perú: N° suelto S/.15

Suscripción anual: S/. 60.00

En el extranjero: Suscripción anual: \$50.00



**CONTENIDO**  
**(Vol. 83 – N° 4 – 2017)**

<b>Editorial</b> .....	369
<b>Trabajos Originales</b>	
- Implementación de una metodología analítica para la cuantificación de proteínas en la microalga <i>Arthrospira platensis</i> por Leenin Flores Ramos, Anthony Ruiz Soto	371
- Determinación y cuantificación de Plumbagina por HPLC-UV extraída de <i>Dionaea muscipula</i> E. cultivada <i>in vitro</i> , por Jorge Chávez Pérez, Ángel Rodríguez Huamán, Lillyan Loayza Gutiérrez, Piero Huari Soto, José Laguna Runser.	382
- Capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle, por Jhanina Rodríguez Carrasco, Paula García-Godos Alcázar.	391
- Efecto tóxico y ecotoxicológico de arenas negras de la minería artesanal en Madre de Dios, por Elsa Huamán Paredes, Denis Vicuña Puente, Lizardo Visitación Figueroa, Lisveth Flores del Pino.	403
- Efectos de liofilización sobre composición química y capacidad antioxidante en pulpa de cuatro variedades de <i>Mangifera indica</i> , por Felipe Surco-Laos, Rocío Tipiana, Ysabel Torres, Manuel Valle, Juan Panay	412
- Síntesis y caracterización de películas de $(\text{WO}_3)_n$ vía sol-gel mediante técnica de recubrimiento por inmersión, por Juan C. Morales Gomero, Alberto Corzo Lucioni, Hugo Alarcón Cavero, Darío Lazo Hoyos.	420
- Optimal conditions for oxidizing phenol in water by fenton and photo-fenton processes, por H.A. Blas López, G.H. Lopes, A.C. Silva Costa Teixeira, C.E. Flores Barreda, P.A. Pantoja.	437
- Estudio químico de las hojas de <i>Datura candida</i> (Pers.) Saff, por Billy Cabanillas Amado, Víctor Reyna Pinedo, Virginia Torpoco Carmen.	442
- Optimización del medio para la producción de proteasas extracelulares por <i>Pseudomonas sp.</i> M211 en fermentación sumergida, por Luis Alejandro-Paredes, Carol N. Flores-Fernández, Amparo I. Zavaleta.	449
- Purificación y caracterización bioquímica de la enzima similar a trombina del veneno de la serpiente <i>Bothrops brazili</i> , por Luis Ruiz, Dan Vivas-Ruiz, Fanny Lazo, Wolfram Seifert, Edith Rodríguez, Gustavo Sandoval, Armando Yarlequé.	463
<b>Informaciones</b>	475
<b>Índice de autores</b>	479
<b>Índice de materias</b>	481

---

**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

### DOPAJE Y CONTROL ANTIDOPAJE EN EL DEPORTE

Las actividades deportivas individuales y colectivas constituyen expresiones de nuestra cultura, y deportes como el fútbol, hoy en día, despiertan pasiones de grandes grupos humanos. Con ello, los deportistas han ido incrementando el desarrollo de sus capacidades físicas, lo que les permite abatir e imponer nuevas marcas en diferentes deportes.

El dopaje es el uso de sustancias o métodos prohibidos en el deporte con la finalidad de obtener mejor rendimiento. El dopaje es inmoral pues se obtienen triunfos deportivos utilizando medios vedados, pone en riesgo la salud del deportista y afecta los preceptos de la competencia limpia en el deporte.

El Comité Olímpico Internacional, seguido de otras organizaciones deportivas internacionales, como la FIFA y otras federaciones, prohibieron el uso de sustancias dopantes, establecieron listas de sustancias prohibidas en el deporte y el control antidopaje con metodología estandarizada para la toma de muestras, selección de deportistas que deben pasar control antidopaje dentro de las competencias (control de todas las drogas) y durante los entrenamientos (principalmente buscando consumo de anabólicos esteroidales), métodos analíticos, y sanciones para los deportistas que infringen las reglas de dopaje.

La Agencia Mundial Antidopaje (WADA-AMA) ha publicado la lista de sustancias prohibidas en el deporte, clasificándolas en nueve grupos: S1) anabólicos esteroidales, S2) hormonas peptídicas, factores de crecimiento, sustancias relacionadas y miméticos, S3) beta 2 agonistas (adrenérgicos), S4) moduladores hormonales y metabólicos, S5) diuréticos y agentes enmascarantes, y los agentes prohibidos en competencias: S6) estimulantes, S7) narcóticos, S8) cannabinoides, S9) glucocorticoides.

Para el control antidopaje el deportista seleccionado en competencia debe asistir al laboratorio antidopaje y emitir dos muestras de orina que se guardan en dos contenedores (Muestra A y Muestra B), las que se sellan y lacran en presencia del deportista y el funcionario de control de dopaje. Las muestras son luego enviadas al laboratorio analítico de control de dopaje correspondiente. Los procedimientos de toma de muestra, recepción y envío de muestras a nivel internacional al laboratorio están regulados y reglamentados. Las muestras de orina son analizadas en un periodo relativamente breve 2 a 3 días, mediante técnicas avanzadas de cromatografía: HPLC-MS y cromatografía gaseosa con detección de masas en Tandem (GC-Tandem MS), que son capaces de detectar más de 600 sustancias prohibidas y sus similares.

Los laboratorios acreditados requieren contar con equipamiento moderno, calibrado y métodos estandarizados de alta reproducibilidad. Los equipos de masas requieren tener librerías de las sustancias prohibidas y sus metabolitos en orina, para acelerar la detección, lo que permite

la determinación cualitativa de la sustancia prohibida, con lo que se asume el consumo de la sustancia prohibida por el deportista y se emite un “resultado analítico adverso”. Conocido el resultado analítico adverso, el deportista puede solicitar la realización del análisis de la muestra B (Contramuestra). Si el resultado no se ratifica el resultado final es doping negativo y se levanta la sanción preventiva. Si el resultado analítico ratifica la sustancia detectada en el primer análisis, la conclusión es doping positivo, y se aplican inhabilitación temporal de hasta cuatro años o definitiva en casos de reincidencia.

En el Perú se ofrece libremente hoja de coca en forma de mate filtrante, cuyo consumo -por contener cocaína- está prohibido en el deporte. El principal metabolito de la cocaína en el cuerpo humano es la Benzoilecgonina que se puede detectar en la orina del deportista entre las tres horas y los cuatro días después de su ingesta o administración por cualquier medio (mate de coca, harina de coca, pasta base fumada, crack fumado, clorhidrato de cocaína aspirado). Existe gran riesgo para los deportistas en el Perú, pues el consumo accidental o no, conduce a la detección del metabolito en la orina con serias consecuencias para el deportista. Debe incrementarse la capacitación de los deportistas, médicos de selecciones y federaciones nacionales y personal de apoyo a fin de prevenir este riesgo.

Dr. Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas

## IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA MICROALGA *Arthrospira platensis*

Leenin Flores Ramos<sup>\*a</sup>, Anthony Ruiz Soto<sup>a</sup>

### RESUMEN

La metodología analítica implementada para la cuantificación de proteínas en la microalga *Arthrospira platensis* por espectrofotometría UV-Vis fue el método de Hartree-Lowry. Para lograr este objetivo, se optimizaron los factores de extracción de proteínas por el método estadístico de diseño de superficie de respuesta de Box Behnken y se obtuvieron los siguientes resultados de los parámetros implementados: la linealidad, donde se reportó un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) mayor a 0,995, en el estudio de repetibilidad un coeficiente de variación menor al 2 %, un porcentaje de recuperación entre 94 % y 101 %, los límites de detección y cuantificación fueron 2,36  $\mu\text{g/mL}$  y 7,86  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente y el estudio de la robustez demostró que el método analítico tuvo mayor sensibilidad al cambio del peso de la muestra y al cambio del volumen de reactivo C respecto al resto de factores evaluados.

**Palabras clave:** Espectrofotometría, microalga, Box Behnken, Youden-Steiner.

## IMPLEMENTATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR QUANTIFICATION OF PROTEINS IN *Arthrospira platensis* MICROALGAE

### ABSTRACT

The Hartree-Lowry method was developed and implemented for quantification of protein in *Arthrospira platensis* microalgae by spectrophotometry UV-Vis. In order to achieve this goal, the protein extraction factors were optimized by Box Behnken design of response surface and the following results of the implementation parameters were obtained: the linearity showed a coefficient of determination ( $R^2$ ) greater than 0.995, a coefficient of variation less than 2% for repeatability, a percentage recovery within 94% to 101%, the limit of detection and limit of quantification were 2.36  $\mu\text{g/mL}$  and 7.86  $\mu\text{g/mL}$  respectively, and the robustness showed that some parameters such as sample weight and volume of reagent C presented high influence in the evaluated factors.

**Key words:** Spectrophotometry, microalgae, Box Behnken, Youden-Steiner.

---

<sup>a</sup> Laboratorio de Análisis Instrumental - Laboratorio de Biotecnología Acuática, Instituto del Mar del Perú, Esquina Gamarra y General Valle s/n Chucuito Callao, Callao, Perú, lflores@imarpe.gob.pe

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, las microalgas han sido ampliamente estudiadas por sus numerosos contenidos de compuestos bioactivos, que son aprovechados para su uso comercial<sup>1</sup>, por ejemplo las microalgas: *Dunaliella salina* para la producción de  $\beta$ -caroteno, *Haematococcus pluvialis* para la producción de Astaxantina, *Schizochytrium* sp. para la producción de ácido docosahexaenoico (DHA), etc.

En particular la microalga *Arthrospira platensis* es producida por la industria como suplemento alimenticio en diferentes países como Estados Unidos, China, Cuba, India, Tailandia, México, Chile y Sud África, debido a su alto contenido de proteínas 50-70 % y aminoácidos esenciales<sup>2</sup>. La cuantificación de proteínas es esencial no solo para garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos, sino también para facilitar su comercio<sup>3</sup>.

Los laboratorios analíticos han desarrollado diversas técnicas para la cuantificación de proteínas, por ejemplo el método normalizado Kjeldahl que se aplica en diferentes matrices como cerveza, leche, pan, etc.<sup>4</sup> y métodos espectrofotométricos como Lowry, Biuret, Bradford y BCA. Por otro lado, el método de Hartree-Lowry (modificación subsecuente del método de Lowry) es un método espectrofotométrico utilizado para la cuantificación de proteínas debido que presenta ventajas tales como su sensibilidad, límite de detección del orden de 15  $\mu$ g de proteína, precisión y fácil implementación<sup>5</sup>.

De acuerdo a normas vigentes, las metodologías no normalizadas deben ser validadas (Resolución N° 0008-2003/INDECOPI-CRT), por ello, la Asociación de las Comunidades Analíticas (AOAC Internacional), Eurachem, el Codex Alimentarius, Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP), ICH, ISO y otros organismos internacionales, recomiendan la implementación del método analítico evaluando los parámetros de desempeño como: veracidad, precisión, especificidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad y robustez<sup>6</sup>.

El objetivo del presente trabajo es implementar el método analítico de Hartree-Lowry para la cuantificación de proteínas en la microalga *Arthrospira platensis* por espectrofotometría UV-Vis.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Muestra

La microalga *Arthrospira platensis* liofilizada fue proveída por la Sala de Procesos – Laboratorio de Biotecnología Acuática, IMARPE.

### Reactivos

Albúmina de suero bovino BSA (Sigma-Aldrich®), hidróxido de sodio P.A. (Merck), tartrato

de sodio y potasio tetrahidratado P.A. (Merck), carbonato de sodio anhidro P.A. (Merck), sulfato de cobre pentahidratado P.A. (Merck), reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu (Merck).

### **Equipos**

Espectrofotómetro UV-Visible Varian Cary 50, Agitador Vórtex ZX Classic VELS Científica, balanza analítica Sartorius MSU225S-000-DU, centrífuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5702R, baño de ultrasonido Branson 2510, campana extractora de gases LABCONCO, baño maría MRC BH-200 y baño maría Eyela SB 2000.

### **Solución patrón de proteínas**

Se pesó 30,0 mg de albúmina de suero bovino, se transfirió a una fiola de 50 mL y se añadió 25 mL de agua ultrapura, se sonicó por 5 min y finalmente se enrasó con agua ultrapura para obtener una concentración de 600 µg/mL.

### **Extracción de proteínas**

Se pesaron 5,0 mg de microalga liofilizada y se añadió 5 mL de hidróxido de sodio, luego se sonicó en baño de ultrasonido por 15 min y se calentó en baño maría para realizar la hidrólisis. Se centrifugó la muestra a 4 °C por 10 min a 3500 rpm y se extrajo 200 µL del sobrenadante para el análisis de proteínas.

### **Método analítico**

Las proteínas extraídas mediante hidrólisis alcalina y las soluciones estándares fueron cuantificadas por el método de Hartree-Lowry, el cual consistió en la adición de 0,9 mL de reactivo A (hidróxido de sodio 0,5 N, carbonato de sodio anhidro 10 % y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 0,2 %), seguido de una incubación a 50 °C durante 10 minutos, luego la adición de 0,1 mL de reactivo B (hidróxido de sodio 0,1 N, sulfato de cobre pentahidratado 1 % y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 2 %) y finalmente la adición de 3 mL de reactivo C (reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu: Agua 2:15 v/v). Se midió las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm.

### **Optimización de los parámetros de extracción de proteínas**

El método estadístico utilizado para la optimización fue el diseño de superficies de Box Behnken<sup>7</sup> y los resultados fueron procesados con el software Minitab 16. Se optimizó la variable respuesta *Absorbancia* con los siguientes factores, sugeridos por Arredondo y Voltolina<sup>8</sup>, *Concentración de hidróxido de sodio* ( $C_{NaOH}$ ), *tiempo de extracción* ( $t$ ) y *temperatura* ( $T$ ). Los niveles de los factores se muestran en la tabla 1. Es necesario mencionar que los valores optimizados fueron los usados en todas las pruebas de implementación.

**Tabla 1.** Factores y niveles del diseño de superficies

Concentración NaOH (N)	Tiempo de extracción (min)	Temperatura (°C)
0,1 (-1)	30 (-1)	60 (-1)
0,5 (0)	45 (0)	80 (0)
0,9 (+1)	60 (+1)	100 (+1)

## Parámetros de la implementación

### Linealidad

Se construyó la curva de calibración por duplicado en el rango de concentración de 30-300 µg/mL usando 10 niveles (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 y 300 µg/mL) y empleando la solución patrón albúmina suero de bovino (BSA).

### Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Estos parámetros se obtuvieron de los valores obtenidos de la pendiente (m) y el error estándar del intercepto (sb) de la curva de calibración de acuerdo a las siguientes fórmulas:  $LOD = 3 * sb / m$  y  $LOQ = 10 * sb / m$ .

### Porcentaje de recuperación

Se evaluó el porcentaje de recuperación usando tres niveles de concentración de fortificación ( $C_a$ ) correspondientes al 25 %, 50 % y 75 % de la concentración estimada del analito en la muestra ( $C_u$ , 80 µg/mL) de acuerdo a la siguiente fórmula:  $\%R = ((C_f - C_u) / C_a) \times 100 \%$  donde  $C_f$  es la concentración del analito en la muestra fortificada.

### Repetibilidad

Se evaluó la repetibilidad analizando nueve muestras independientes bajo las siguientes condiciones: un mismo analista, mismo laboratorio, intervalos de tiempos cortos y los mismos equipos.

### Robustez

Se aplicó la metodología de Youden-Steiner<sup>9</sup> y se seleccionaron los siguientes factores, de acuerdo al criterio del laboratorio, *Peso de muestra*: A = 5 mg, a = 7 mg; *Volumen de Reactivo A*: B = 900 µL, b = 1000 µL; *Volumen de Reactivo B*: C = 100 µL, c = 150 µL; *Volumen de Reactivo C*: D = 3mL, d = 4mL; *Tiempo de incubación luego de añadir Reactivo A*: E = 10 min, e = 5 min; *Tiempo de incubación luego de añadir Reactivo B*: F = 0 min, f = 10 min y el *Tiempo de lectura*: G = instante, g = después de 30 min.

**Tabla 2.** Prueba de robustez de Youden y Steiner

Factores	Experimentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Peso de muestra	A	A	A	A	a	a	a	a
Volumen de Reactivo A	B	B	b	b	B	B	b	b
Volumen de Reactivo B	C	c	C	c	C	c	C	c
Volumen de Reactivo C	D	D	d	d	d	d	D	D
Tiempo de incubación luego de añadir Reactivo A	E	e	E	e	e	E	e	E
Tiempo de incubación luego de añadir Reactivo B	F	f	f	F	F	f	f	F
Tiempo de lectura	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Los efectos fueron calculados con la siguiente formula:

$$E_x = \frac{\sum Y(+)}{n/2} - \frac{\sum Y(-)}{n/2}$$

Donde  $E_x$  son los efectos del factor  $x$ ,  $\sum Y(+)$  es la suma de los resultados del factor  $x$  en el extremo superior del intervalo definido,  $\sum Y(-)$  es la suma de los resultados del factor  $x$  en el extremo inferior del intervalo definido y  $n$  es el número total de experimentos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

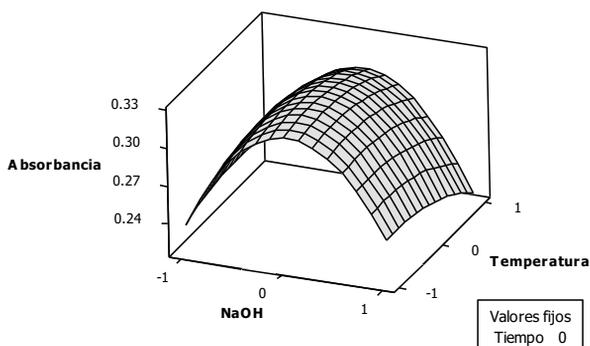
### Optimización de los parámetros de extracción de proteínas:

Los resultados del diseño de superficies se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Resultados de la matriz del diseño de superficies

Experimento	Concentración de NaOH	Tiempo de extracción	Temperatura	Absorbancia
12	0	+1	+1	0,3187
5	-1	0	-1	0,2333
13	0	0	0	0,3016
15	0	0	0	0,3278
1	-1	-1	0	0,2430
6	+1	0	-1	0,2334
4	+1	+1	0	0,2733
7	-1	0	+1	0,2568
8	+1	0	+1	0,2240
10	0	+1	-1	0,3491
11	0	-1	+1	0,2896
14	0	0	0	0,3336
3	-1	+1	0	0,2594
2	+1	-1	0	0,2462
9	0	-1	-1	0,3267

Al graficar la *Absorbancia vs la Concentración de NaOH* y la *Temperatura* se puede apreciar una tendencia cuadrática en la superficie debido a la curvatura formada en los niveles del factor concentración NaOH.



**Figura 1.** Gráfica de superficies de la Absorbancia vs Temperatura, NaOH

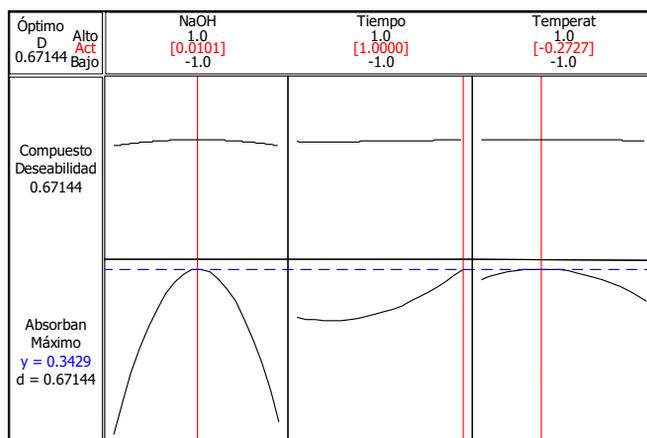
El análisis de varianza del diseño de superficies (tabla 4) confirma que el modelo cuadrático es significativo ( $p$ -valor = 0,003) para un nivel de significancia ( $\alpha$ ) igual a 0,05. Los efectos de las interacciones y términos lineales no fueron significativas ( $p$ -valor  $>$   $\alpha$  = 0,05). De otro lado, los efectos de los términos cuadráticos fueron significativos solo en el caso de la concentración de NaOH ( $p$ -valor = 0,001  $<$   $\alpha$  = 0,05). La ecuación de regresión resultante fue la siguiente:

$$\text{Absorbancia} = 0,321 - 0,002C_{\text{NaOH}} + 0,012t - 0,007T + 0,003C_{\text{NaOH}}t - 0,008C_{\text{NaOH}}T + 0,002tT - 0,075C_{\text{NaOH}}^2 + 0,009t^2 - 0,009T^2$$

**Tabla 4.** Análisis de Varianza (ANOVA) del diseño de superficies

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	P valor
Regresión	9	0,02343	0,02343	0,00260	0,019
Lineal	3	0,00152	0,00152	0,00051	0,332
NaOH	1	0,00003	0,00003	0,00003	0,779
Tiempo	1	0,00113	0,00113	0,00113	0,131
Temperatura	1	0,00036	0,00036	0,00036	0,357
Cuadrado	3	0,02160	0,02160	0,00720	<b>0,003</b>
NaOH*NaOH	1	0,02091	0,02068	0,02068	<b>0,001</b>
Tiempo*Tiempo	1	0,00037	0,00032	0,00032	0,38
Temperatura*Temperatura	1	0,00032	0,00032	0,00032	0,382
interacción	3	0,00031	0,00031	0,00010	0,826
NaOH*Tiempo	1	0,00003	0,00003	0,00003	0,785
NaOH*Temperatura	1	0,00027	0,00027	0,00027	0,417
Tiempo*Temperatura	1	0,00001	0,00001	0,00001	0,864
Error residual	5	0,00173	0,00173	0,00035	
Falta de ajuste	3	0,00115	0,00115	0,00038	0,459
Error puro	2	0,00058	0,00058	0,00029	
Total	14	0,02516			

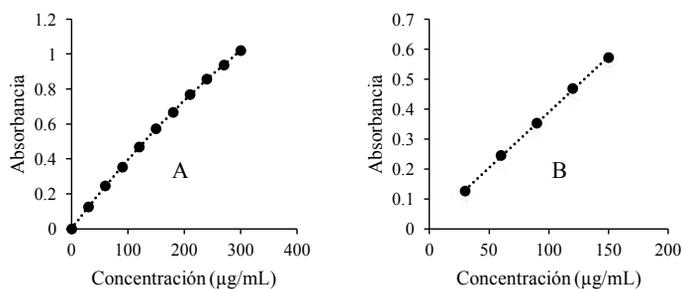
Al optimizar la ecuación con el software se obtuvieron las condiciones óptimas de extracción de proteínas (figura 2): concentración de NaOH = 0,5 N [0,0101], tiempo = 60 min [1,0000] y temperatura = 75 °C [-0,2727].



**Figura 2.** Gráfica de optimización de los factores

### Linealidad

Al graficar los resultados de la prueba de linealidad (figura 3) se observa que la curva de calibración no presenta linealidad en todo su rango experimental (figura 3A), debido a ello se seleccionó el intervalo de trabajo de 30-150  $\mu\text{g/mL}$  (5 niveles) donde se observa linealidad (figura 3B).



**Figura 3.** Gráfico de dispersión de la prueba de linealidad

Para validar si el modelo es de regresión lineal en el intervalo de trabajo de 30-150  $\mu\text{g/mL}$  se verificaron cuatro supuestos estadísticos:

#### 1.- Supuesto de linealidad

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) 0,9995, superó el valor de referencia  $R^2 \geq 0,995$ , usualmente aceptados en los laboratorios como criterio de aceptación<sup>10, 11</sup>, asegurando el supuesto de linealidad.

#### 2.- Supuesto de independencia de los residuos

El estadístico de Durbin-Watson presentó un valor de 2,33 cercano al valor referencial 2 indicando independencia o incorrección de los residuos.

#### 3.- Supuesto de residuos constantes (Homocedasticidad)

La prueba estadística de homocedasticidad contrasta la hipótesis nula de que variable respuesta tiene varianzas iguales en cada nivel del factor. La prueba de Bartlett presentó un  $p\text{-valor} = 0,951 > \alpha = 0,05$ , indicando que las varianzas de los residuos no presentan diferencias significativas, asegurando el supuesto de homocedasticidad.

#### 4.- Supuesto de normalidad de residuos

La prueba estadística de normalidad contrasta la hipótesis nula de que la variable tiene una distribución normal. El estadístico Kolmogorov - Smirnov presentó un  $p\text{-valor} = 0,090 > \alpha = 0,05$ , por lo tanto los residuos presentan una distribución normal.

La tabla 5 muestra los estadísticos de la regresión del modelo lineal.

**Tabla 5.** Análisis de regresión de la Absorbancia vs Concentración

Fuente	SS	df	MS	Numero de observaciones	10	
Modelo	0,24876	1	0,24876	ANOVA		
Residual	0,00012	8	0,00001	F (1,8)	16037,51	
Total	0,24888	9	0,27653	p-valor	<b>0,0000</b>	
				$R^2$	0,9995	
	Coefficiente	Error estándar	t	P >  t	(Intervalo de confianza al 95 %)	
pendiente	0,00371	0,00003	126,64	0,000	0,00364	0,00378
intercepto	0,01822	0,00292	6,24	0,000	0,01149	0,02496

El análisis de varianza (ANOVA) de regresión muestra que los coeficientes de regresión son significativamente diferentes de cero ( $p\text{-valor} < \alpha = 0,05$ ).

El intervalo de confianza al 95 % de la pendiente fue [0,00364 - 0,00378]. Finalmente el modelo de regresión fue:

$$\text{Absorbancia} = 0.01822 + 0.00371 * [\text{Concentración}]$$

### Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

En el rango de trabajo de la curva de calibración de 30 a 150  $\mu\text{g/mL}$ , el  $s_b = 0,00292$  y el  $m = 0,00371$ , por lo tanto el  $\text{LOD} = 2,36 \mu\text{g/mL}$  y el  $\text{LOQ} = 7,86 \mu\text{g/mL}$ . Estos valores se encuentran en el orden con lo reportado por Hartree<sup>5</sup>.

### Porcentaje de recuperación

Los resultados (tabla 6) muestran que el promedio de los porcentajes de recuperación para las concentraciones estudiadas es 97,13 % y se encuentra dentro del rango de aceptación (90 – 107 %) de acuerdo al Manual del Codex Alimentarius<sup>12</sup>, por lo que se puede aseverar que el efecto de la matriz no es significativo.

**Tabla 6.** Valores de porcentaje de recuperación

Nivel de concentración	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperación ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperación (%)
Muestra	78,21	79,72	-	-
	81,03			
	79,92			
Nivel 1 (25%)	98,37	99,74	20,02	100,09
	99,50			
	101,34			
Nivel 2 (50%)	115,58	117,65	37,93	94,82
	118,37			
	119,00			
Nivel 3 (75%)	136,63	137,61	57,89	96,49
	138,37			
	137,84			
			Promedio	97,13

### Repetibilidad

La tabla 7 muestra la precisión bajo condiciones de repetibilidad, el resultado fue un coeficiente de variación ( $\text{CV \%} = 1,79 \%$ ) y se encuentra dentro del límite de referencia establecido<sup>9</sup> ( $\text{CV \%} < 5,3 \%$ ).

**Tabla 7.** Resultados obtenidos de la prueba de repetibilidad

Réplica	Proteína (%)
1	41,11
2	40,26
3	40,57
4	41,24
5	42,22
6	40,24
7	41,03
8	40,91
9	39,70
Promedio	40,81
Desviación Estándar	0,73
CV %	1,79 %

## Robustez

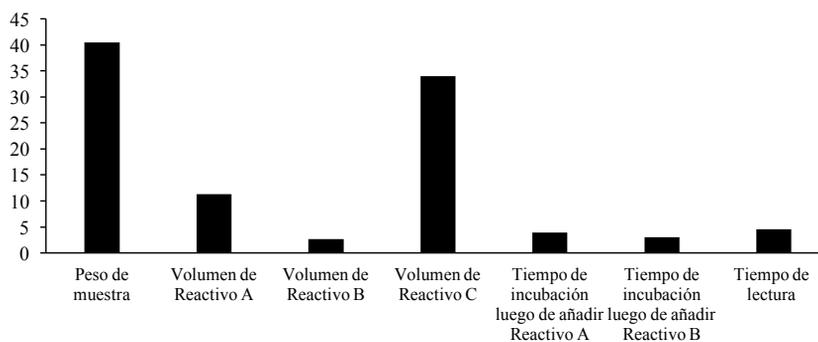
La tabla 8 muestra los resultados de los tratamientos de acuerdo al diseño factorial de Youden-Steiner.

**Tabla 8.** Resultados del diseño factorial de Youden-Steiner

Tratamientos	s	t	u	v	w	x	y	z
Proteínas %	39,34	43,48	28,35	28,06	20,14	19,35	26,30	26,39

La figura 4 muestra la proporción de los efectos, donde los factores más sensibles del método analítico fueron el peso de la muestra y el volumen de reactivo C. Posiblemente, al incrementar el peso de muestra no se logre una completa extracción de proteínas y puede disminuir el resultado final. El exceso del volumen de reactivo C, Folin-Ciocalteu, puede disminuir el pH y generar que el óptimo de absorbancia disminuya y alterar el resultado final.

Los factores menos sensibles (más robustos) fueron el volumen de Reactivo A, volumen de Reactivo B, tiempos de incubación y el tiempo de lectura.



**Figura 3.** Efecto de los parámetros en el método analítico expresado en porcentaje

## CONCLUSIONES

Se logró optimizar las condiciones de extracción e implementar la metodología analítica para la cuantificación de proteínas en la microalga *Arthrospira platensis* por espectrofotometría UV-Vis.

Las condiciones óptimas de extracción de proteínas en la microalga *Arthrospira platensis* fueron la concentración de NaOH = 0,5 N, tiempo = 60 min y temperatura = 75 °C.

Los parámetros obtenidos de la implementación fueron: linealidad presentó un coeficiente de determinación de 0,9995; el límite de detección fue 2,36 µg/mL y el límite de cuantificación fue 7,86 µg/mL; el porcentaje de recuperación fue 97,13 %; la precisión en condiciones de

repetibilidad del método analítico presentó un CV % de 1,79 % y la robustez demostró que el método analítico es sensible al cambio en el peso de muestra y volumen de reactivo C.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al laboratorio de Sala de Procesos por producir la muestra para nuestras pruebas y al Instituto del Mar del Perú por el apoyo brindado para la ejecución de este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Priyadarshani I, Rath B. Commercial and industrial applications of microalgae – A review. *J Algal Biomass Utln.* 2012; 3(4): 89-100.
2. Rojas E, Ávila M, Parada G. Aplicación de estrategias nutricionales y su efecto en el crecimiento en el cultivo continuo de *Spirulina (Arthrospira platensis)*. *Lat Am J Aquat Res.* 2012; 40(3): 763-771.
3. Moore JC, DeVries JW, Lipp M, Griffiths JC, Abernethy DR. Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2010; 9: 330-357.
4. AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International. Rockville Maryland USA: AOAC International; 2016. ISBN: 0-935584-87-0.
5. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* 1972; 48(2):422-7.
6. INDECOPI. Aprueban Guía para la validación de Métodos de Ensayo y las Directrices para la Implementación y Evaluación de métodos de Ensayo Sensoriales. [Internet]. El Peruano, 01 de Febrero de 2003, págs. 238363-238366. [consultado 15 jun 2017]. Disponible en: <http://www.inacal.gob.pe/inacal/images/docs/acreditacion/requisitos-para-solicitar-acreditacion/laborarios-ensayo-calibracion/guiaValidacion.pdf>
7. Box G, Draper NR. Empirical model-building and response surfaces. Hoboken, New Jersey: Wiley; 1987. ISBN-10: 047471810339.
8. Arredondo B, Voltolina D. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; 2007. ISBN: 968-5715-51-3.
9. AEFI. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos en la Industria; 2001.
10. EPA. Method 6020B: Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry. [Internet] SW-846 Update V; 2014. [Consultado el 12 ago 2017]. Disponible en: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/6020b.pdf>
11. Srinivas CS, Puranik SB. HPLC Method Development and Validation for Dissolution of Vancomycin Hydrochloride from the Capsules. *IJPPR.* 2015; 4(2): 301-314.
12. FAO. Codex Alimentarius Commission Procedure Manual. Twenty-first edition. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2010.

## DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PLUMBAGINA POR HPLC-UV EXTRAIDA DE *Dionaea muscipula* E. CULTIVADA *in vitro*

Jorge Chávez Pérez<sup>(a)</sup>, Ángel Rodríguez Huamán<sup>(a)</sup>, Lillyan Loayza Gutiérrez<sup>(a)</sup>,  
Piero Huari Soto<sup>(b)</sup>, José Laguna Runser<sup>(b)</sup>

### RESUMEN

*Dionaea muscipula* llamada “venus atrapamoscas”, es la única especie del género *Dionaea* perteneciente al grupo de las “plantas carnívoras” que además de su atractivo ornamental, hoy es estudiada para el aislamiento de metabolitos secundarios, habiéndose encontrado diversos compuestos con actividad directa en diferentes enfermedades. La plumbagina (2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona) ha sido reportada en diferentes especies de géneros como Plumbago (Plumbaginaceae), Drosera y *Dionaea* (Droseraceae) y Diospyros (Ebenaceae) describiéndose actividades como antiespasmódica, antibacteriana, antifúngica antiparasitaria, antidolor reumático y anticancerígena.

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un método fiable por cromatografía HPLC UV para la determinación de plumbagina. El método presentó una linealidad  $r^2 = 0.997569$  para concentraciones entre 10 y 50  $\mu\text{g/ml}$ , con límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) de 0.09  $\mu\text{g/ml}$  y de 0,3  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. La precisión de los resultados fue expresada como un %RSD de 1,34 para el análisis intradiario y de 5,76 para el análisis interdiario. En la exactitud se obtuvo una recuperación máxima de plumbagina de 94,71 %. Se concluye que el método propuesto es simple, exacto y preciso y puede ser ensayado para la determinación rápida de plumbagina.

**Palabras clave:** Plumbagina, naftoquinona, HPLC. *Dionaea muscipula*, planta carnívora.

---

<sup>(a)</sup> Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima - Perú. [jchavezp@lamolina.edu.pe](mailto:jchavezp@lamolina.edu.pe)

<sup>(b)</sup> Laboratorio de Biotecnología del Programa de Cereales y Granos Nativos de la Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima - Perú.

## DETERMINATION AND QUANTIFICATION OF PLUMBAGINA BY HPLC-UV EXTRACTED FROM *Dionaea muscipula* E. CULTIVATED *in vitro*

### ABSTRACT

Background: *Dionaea muscipula* called "venus flytrap" is the only species of the genus *Dionaea* belonging to the group of "carnivorous plants" that besides its ornamental appeal nowadays is studied for the isolation of secondary metabolites, having finding various compounds with direct activity in different diseases. Plumbagin (2-methyl-5-hydroxy-1,4-naphthoquinone), has been reported in different genres such as *Plumbago* species (*Plumbaginaceae*), *Drosera* and *Dionaea* (*Droseraceae*) and *Diospyros* (*Ebenaceae*) describing activities like antispasmodic, antibacterial, antiparasitic antifungal, anti-rheumatic pain and anti-cancer.

The aim of this study is to develop a method by HPLC UV reliable for the determination of plumbagina. The method presented a linearity  $r^2 = 0.997569$  for concentrations between 10 and 50 ug / ml, with limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) of 0.09 g / ml and 0.3 ug/ ml respectively. The accuracy of the results was expressed as a% RSD of 1.34 to 5.76 intra diary and inter diary for analysis. The accuracy in maximum recovery of 94.71% plumbagina was obtained. It is concluded that the proposed method is simple, accurate and precise and can be tested for the rapid determination of plumbagina.

**Key words:** Plumbagin, naphthoquinone, HPLC. *Dionaea muscipula*, carnivorous plant.

### INTRODUCCIÓN

*Dionaea* es un género monotípico conformado por la especie *Dionaea muscipula* o comúnmente llamada "venus atrapamoscas", una especie perteneciente al grupo de las "plantas carnívoras", cuyo nombre científico está integrado por las siguientes partes: *Dionaea*: proviene del latín "Diana", que es la diosa griega de la caza; *muscipula*: proviene del latín "musci", significa "mosca", mientras que "pula" significa "atrapa", así que *muscipula* no es más que "atrapamoscas" escrito en latín; y Ellis: En honor al británico John Ellis, que fue el que describió por primera vez a esta planta en 1770.

*D. muscipula* Ellis se encuentra en suelos pobres en nitrógeno y fósforo, son plantas de porte bajo, de crecimiento lento, resistentes al fuego y a temperaturas bajas; sobreviven muy bien en suelos arenosos y de turba húmeda. Aunque se ha trasplantado y cultivado en muchos lugares de todo el mundo con éxito, es nativa de los pantanos costeros del norte y de Carolina del Sur, en los Estados Unidos, específicamente, dentro de un radio de 60 millas de Wilmington, Carolina del Sur<sup>1,2</sup>.

Tradicionalmente, la propagación se lleva a cabo con semillas, esquejes de hojas, porciones basales de la planta y, de vez en cuando, por la apomixis en el tallo de la flor<sup>3</sup>. El cultivo de tejidos de *D. muscipula* es la técnica actual de multiplicación más usada por los productores ornamentales.

A pesar de su atractivo ornamental, en los últimos años, se ha venido estudiando al grupo de las plantas carnívoras por las enzimas y actividades relacionadas a la digestión de las presas<sup>4,5-7</sup>, lo que conllevó a estudios de aislamiento de metabolitos secundarios, encontrándose diversos compuestos que tienen efecto directo en enfermedades respiratorias, digestivas y a manera de prevención contra el cáncer<sup>8-11</sup>.

La plumbagina (2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona) se encuentra en las hojas, corteza y raíces de diferentes especies de géneros como *Plumbago* (Plumbaginaceae), *Drosera* (Droseraceae) y *Diospyros* (Ebenaceae). Se ha descrito el uso de *Plumbago zeylanica* en el tratamiento del dolor reumático, en donde la plumbagina se muestra como la responsable de tal efecto. Otras actividades descritas para la plumbagina son como antiespasmódica, antibacteriana, antifúngica antiparasitaria y anticancerígena<sup>12</sup>

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material y métodos

#### Material biológico

El material biológico empleado fueron plantas de *Dionaea muscipula* E. de siete meses de edad, pertenecientes a la empresa SK Vivero. Los ejemplares fueron cultivados bajo sistema *in vitro*, con 30 ml de medio Murashige Skoog (MS) modificado, con adición de sacarosa (30 g/l), agar SIGMA (5 g/l) y carbón activado (4 g/l) en frascos de 80 ml de volumen. La condiciones ambientales del cultivo fueron programadas para un fotoperiodo de 16-8 horas de luz/sombra, temperatura de 25 °C +/- 1 °C y una humedad del cuarto de incubación del 40 %.

#### Reactivos químicos

- Medio de cultivo Murashige Skoog (MS)
- Sacarosa
- Agar (SIGMA)
- Ácido acético glacial grado HPLC
- Agua ultra pura grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Cloroformo grado HPLC

#### Instrumentación

El equipo para el análisis cromatográfico por HPLC-UV fue un Hitachi Elite LaChromm, con el Software EZChrom Elite v3.3.2, equipado con bomba L-2130, válvula gradiente baja

presión L-2130ACC, degasificadora L-2000ACC, Interface USB IFU, horno de columnas L-2350, Inyector manual 7725i-006, mezclador cuaternario de solventes. El detector utilizado fue el Hitachi UV Detector L-2400; a una longitud de onda de 260 nm. Todos los ensayos cromatográficos fueron realizados en el laboratorio de análisis instrumental del Instituto de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular de la UNALM, 2016.

#### Obtención del extracto

Las plantas de *Dionaea muscipula* cultivadas *in vitro* fueron colocadas en frascos previamente seleccionados, retirando todo el medio de cultivo excedente de las plantas a través de lavados sucesivos con agua destilada, dejándose secar posteriormente durante 72 horas en una cámara con 35 % de humedad ambiental y bajo sombra, la cual fue instalada en el cuarto de incubación de la empresa SK Vivero. Concluido el tiempo de secado, se pesó una muestra de 1 gramo y se pulverizó en un mortero de porcelana. La muestra fue colocada en un cartucho de filtro para el proceso de extracción en un equipo Soxhlet, empleando como solvente cloroformo grado HPLC y realizando 10 ciclos de extracción durante dos horas. Terminado el proceso de extracción se recuperó el solvente por destilación, hasta dejar una muestra de 92 ml, la cual fue empleada para el análisis cromatográfico por HPLC. La muestra fue almacenada bajo sombra y a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Cuantificación de Plumbagina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

#### Preparación de los estándares

La solución stock de Plumbagina (1mg/mL) fue preparada con metanol grado HPLC y almacenada en oscuridad a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A partir de esta solución se prepararon los diferentes puntos de calibración (10, 20, 30, 40 y  $50\mu\text{g/ml}$ ). Las soluciones fueron filtradas mediante un filtro de membrana de teflón de  $0,45\ \mu\text{m}$  antes de ser inyectado en el equipo de HPLC. Cada concentración fue inyectada seis veces en el HPLC-UV, analizándose los coeficientes de correlación ( $r$ ), coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y la ecuación de la recta.

#### Preparación de la muestra

El extracto se concentró en un rotavapor marca Büchi modelo R-3000, durante 1 hora a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El extracto concentrado se resuspendió en metanol HPLC y se llevó a aforó hasta un volumen de 50 ml.

#### Análisis cualitativo y cuantitativo

El análisis cualitativo del analito se realizó en base al tiempo de retención del pico cromatográfico del estándar puro con una ventana de retención de 5 %. Para el análisis cuantitativo se estableció una correlación entre el área del pico cromatográfico y la concentración. Los resultados de concentración fueron expresados como microgramo por 100 gramos de muestra seca ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ).

#### Linealidad

La linealidad se evaluó mediante el análisis de la relación entre la concentración de plumbagina y la absorbancia reportada por el detector UV. El coeficiente de determinación

( $r^2$ ) se calculó por ajuste de mínimos cuadrados. Para la realización de la curva de calibración, cada punto se inyectó por quintuplicado.

#### Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) fueron calculados usando las expresiones  $3\sigma/s$  y  $10\sigma/s$ , respectivamente; en donde “ $\sigma$ ” es la desviación estándar interceptada y “ $s$ ” es la pendiente de la curva de calibración.

#### Precisión

La precisión del método indica el grado de dispersión entre los resultados obtenidos de la determinación del analito en una misma muestra. Tres concentraciones de solución estándar de plumbagina (10, 30 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ) fueron analizadas en el mismo día (repetibilidad). Asimismo, una concentración de estándar fue analizada en dos días por diferentes analistas (precisión intermedia) y se determinó la desviación estándar relativa (% RSD). Las tres muestras de cada nivel fueron preparadas e inyectadas en el HPLC por quintuplicado.

#### Exactitud

La exactitud se reportó como el porcentaje de recuperación. Este parámetro muestra la proximidad entre el valor obtenido de forma experimental y el valor real calculado, asegurando que no se produzcan pérdidas durante el análisis. Para ello, se evaluó una muestra diluida 1:2, adicionándole 15  $\mu\text{g/ml}$  de estándar. La muestra se inyectó por quintuplicado en el equipo de HPLC. El Porcentaje de recuperación es igual a la diferencia de los valores mostrados para el estándar con muestra y la muestra por 100 entre el valor añadido de estándar.

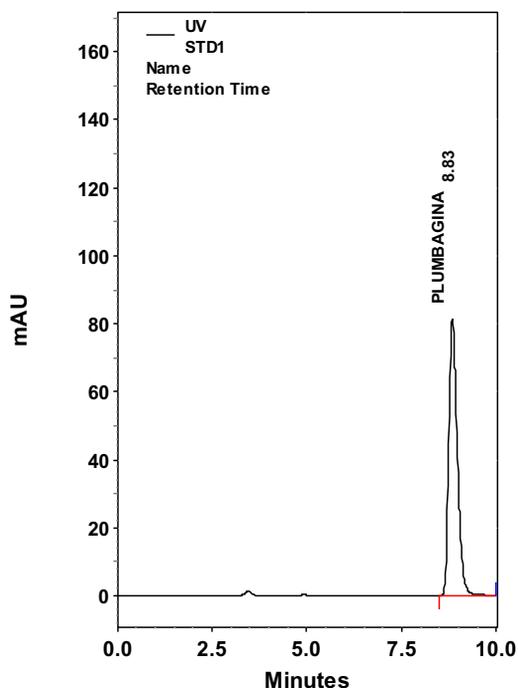
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico del estándar de plumbagina fue realizado con una fase móvil isocrática formada por ácido acético glacial 0.1 M en agua y metanol 33:67 (v/v), la columna empleada fue Waters Bridge Columns® X-Bridge TM C-18 (4.6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), flujo de 0,75 ml/min. El volumen de inyección de todas las muestras y estándares fue de 20  $\mu\text{l}$  con un tiempo de resolución del cromatograma de 10 minutos.

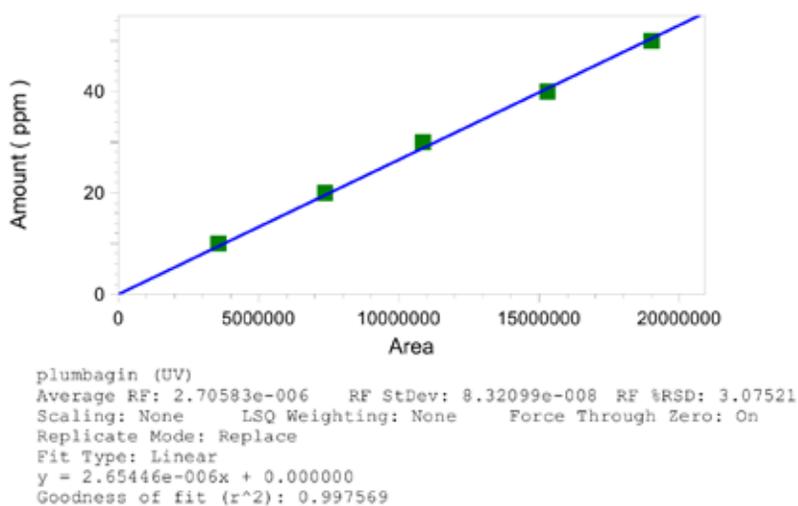
#### Análisis cualitativo

Se determinó que el estándar de plumbagina se encuentra bien definido con un tiempo de retención de 8,83 minutos, como se observa en el cromatograma de la figura 1.

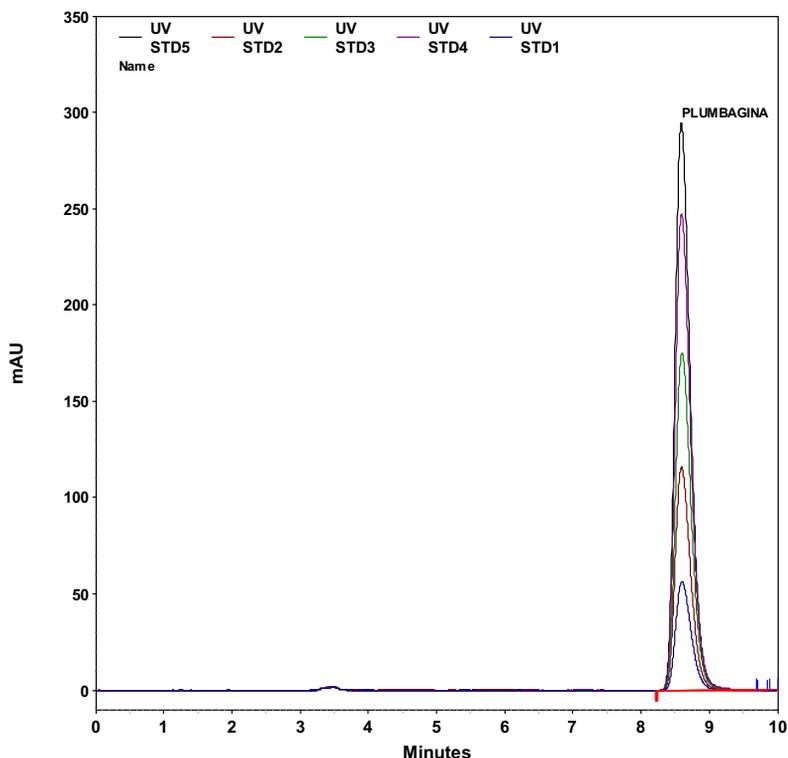


**Figura 1.** Cromatograma del estándar de plumbagina y determinación del tiempo de retención.

Linealidad: Como se observa en la figura 2, la curva de calibración de plumbagina presenta un valor de coeficiente de determinación  $r^2$  de 0.997569 para concentraciones entre 10 y 50  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 2.** Curva de calibración de Plumbagina



**Figura 3.** Perfil cromatográfico de plumbagina a diferentes concentraciones. Se observa superposición de los picos de cinco diferentes concentraciones de plumbagina en el mismo tiempo de retención

#### Límites de detección y cuantificación

Para plumbagina, el límite de detección determinado (LOD) es 0,09  $\mu\text{g/ml}$  y el límite de cuantificación (LOQ) es 0,3  $\mu\text{g/ml}$ .

#### Precisión

La precisión de los resultados del análisis de plumbagina fue expresada como desviación estándar relativa (%RSD), obteniéndose valores de 1,34 para el análisis intradiario (repetibilidad) y de 5,76 para el análisis interdiario (precisión intermedia).

#### Exactitud

Se obtuvo un porcentaje de recuperación máxima de plumbagina de 94,71 % en la cuantificación del contenido de plumbagina.

#### Expresión de resultados

La concentración de plumbagina en la muestra se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\mu\text{g de plumbagina} / 100 \text{ g de muestra seca} = \text{LHPLC} * \text{F} * 100 / \text{Co}$$

Donde:

L<sub>HPLC</sub>:  $\mu\text{g/ml}$  plumbagina medidos en el HPLC

F: Factor de dilución ejm: 1 en 10 = 10

Co: Concentración del extracto a analizar en g/ml

## CONCLUSIONES

La necesidad de encontrar nuevas estructuras químicas con actividades biológicas más selectivas y con menores efectos adversos, requiere de ensayos y metodologías validadas en su simpleza, exactitud y precisión y que puedan ser aplicadas para la determinación y cuantificación de estos biocompuestos. Los resultados en el método por HPLC de linealidad, ( $r_2 = 0.997569$  para concentraciones entre 10 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ), con límites de detección y límites de cuantificación (con valores de 0,09  $\mu\text{g/ml}$  y 0,3  $\mu\text{g/ml}$  para LOD y LOQ, respectivamente) y la precisión representada en porcentajes de RSD de 1,34 para la repetibilidad (análisis intradiario) y de 5,76 para la precisión intermedia (análisis interdiario), describen un método adecuado para la determinación y cuantificación de plumbagina por cromatografía por HPLC-UV con un porcentaje de recuperación máxima de plumbagina de 94,71 %. Por lo tanto, el método puede ser aplicado para la determinación rápida de plumbagina.

## AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue realizado gracias al apoyo de INNOVATE PERÚ, con el proyecto PIMEN – N°573 – 2015.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Brittnacher J. Growing *Dionaea muscipula*. [Internet]. International Carnivorous Plant Society; 2016. [actualizado Jun 2016]. Disponible en: <http://www.carnivorousplants.org/howto/GrowingGuides/Dionaea.php>
2. Anchor J. Stealing Venus Flytrap plants now a felony [Internet]. Wilmington, North Caroline; 18 set 2014. [actualizado Jun 2016]. Disponible en: <http://www.wect.com/story/26320766/stealing-venus-flytrap-plants-now-a-felony>
3. Pietropaolo J, Pietropaolo P. Carnivorous Plants of the World. Portland, Oregon: Timber Press; 1986.
4. Mozingo H, Klein P, Zeevi Y, Lewis E. Venus Flytrap observations by scanning electron microscopy. *Am Bot*. 1970; 57: 593-598.
5. Robbins R. The nature of the stimuli causing digestive juice secretion in *Dionaea muscipula* Ellis (Venus's Flytrap). *Planta*. 1976; 128: 263-265.

6. Scala J, Iott K, Schwab D, Semersky F. Digestive secretion of *Dionaea muscipula* (Venus's-Flytrap). *Plant Physiol.* 1969; 44: 367-371.
7. Slack A. *Carnivorous Plants*. Sidney: Doubleday Australia; 1981.
8. Banasiuk R, Kawiak A, Krolicka A. In vitro cultures of carnivorous plants from the *Drosera* and *Dionaea* genus for the production of biologically active secondary metabolites. *BioTechnologia.* 2012; 93(2): 87-96.
9. Finnie J, Van Staden J. *Drosera* spp. (sundew): Micropropagation and *in vitro* production of plumbagin. *Biotechnol Agric For.* 1993; 24:164-177.
10. Gaascht F, Dicato M, Diederich M. Venus Flytrap (*Dionaea muscipula* Solander ex Ellis) Contains Powerful Compounds that Prevent and Cure Cancer. *Front Oncol.* 2013; 3:202. doi: 10.3389/fonc.2013.00202.
11. Pakulski G, Budzianowski J. Ellagic acid derivatives and naphthoquinones of *Dionaea muscipula* from *in vitro* cultures. *Phytochemistry.* 1996; 4: 775–778.
12. Hsieh YJ, Lin LC, Tsai TH. Determination and identification of plumbagin from the roots of *Plumbago zeylanica* L. by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2005; 1083(1-2):141-5.

## CAPACIDAD PROBIÓTICA DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE CHICHA DE MOLLE

Jhanina Rodríguez Carrasco, Paula García-Godos Alcázar<sup>a\*</sup>

### RESUMEN

La investigación tuvo como objetivos aislar e identificar bacterias lácticas (BAL), evaluar la capacidad probiótica *in vitro* e *in vivo* de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle, para ello se muestreó chichas de molle elaboradas artesanalmente de las provincias de Huanta y Huamanga, aislando 55 cepas BAL e identificando a *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus maltaromicus* y *Leuconostoc mesenteroides* en base a la coloración Gram, producción de gas, gluconato y fermentación de azúcares. Para evaluar la capacidad probiótica *in vitro* se realizaron pruebas de antagonismo entre BAL con cuatro microorganismos patógenos (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Candida albicans* ATCC 90028), mostrándose que 14 de las 55 cepas BAL producen sustancias inhibitorias de amplio espectro; asimismo, se evaluó la capacidad de tolerancia a condiciones gastrointestinales de cepas BAL, realizando ensayos a diferentes pH<sub>s</sub>, diferentes concentraciones de sales biliares y extracto gástrico artificial, resultando 25 cepas BAL con capacidad de tolerancia gastrointestinal y se seleccionaron cuatro cepas con mayor diámetro de halos de inhibición y cepas tolerantes a condiciones gastrointestinales siendo las cepas: BL-1 (*Lactobacillus plantarum*), BL-26 (*Lactobacillus maltaromicus*), BL-27 (*Lactobacillus plantarum*) y BL-53 (*Lactobacillus maltaromicus*), a las cuales se evaluaron la capacidad probiótica *in vivo* en 20 ratas para luego realizar recuento de BAL en el intestino a los 21 días, encontrándose en el grupo de estudio con BAL a  $60 \times 10^{19}$  UFC/mL, mientras en el tratamiento con BAL más yacón a  $25 \times 10^{24}$  UFC/mL y los tratamientos de yacón y control a  $50 \times 10^{14}$  UFC/mL de BAL obteniéndose una de ganancia de peso en ratas en el grupo de estudio de BAL más yacón de 46 g, mientras con bacterias lácticas se tuvo 24 g y 16 g en el grupo control y extracto de yacón. En consecuencia esta investigación demuestra que la toma diaria de bebidas fermentadas tradicionales favorece el incremento de *Lactobacillus* en la microbiota intestinal.

**Palabras clave:** Bacterias lácticas, capacidad probiótica, yacón, chicha de molle.

---

<sup>a\*</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional San Cristóbal de Humanga, Portal Independencia N° 57. Ayacucho-Perú. paulagga30@hotmail.com

## PROBIOTIC CAPACITY OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM CHICHA OF MOLLE

### ABSTRACT

The objective of the research was to isolate and identify lactic acid bacteria (BAL), to evaluate the *in vitro* and *in vivo* probiotic capacity of lactic bacteria isolated from chicha of molle. For this purpose, samples of chicha of molle were prepared from the provinces of Huanta and Huamanga, isolating 55 BAL strains and identifying *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus maltaromicus* and *Leuconostoc mesenteroides* based on Gram stain, gas production, gluconate and fermentation of sugars. In order to evaluate the *in vitro* probiotic capacity, BAL antagonism with four pathogenic microorganisms (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Candida albicans* ATCC 90028) was performed, showing that 14 of the 55 BAL strains produce broad spectrum inhibitory substances. Evaluated the capacity of tolerance to gastrointestinal conditions of BAL strains, performing tests at different pHs, different concentrations of bile salts and artificial gastric juice, resulting 25 BAL strains with capacity of gastrointestinal tolerance and 4 strains were selected with greater diameter of inhibition halos and (*Lactobacillus plantarum*), BL-26 (*Lactobacillus maltaromicus*), BL-27 (*Lactobacillus plantarum*) and BL-53 (*Lactobacillus maltaromicus*), which were evaluated for probiotic capacity in live in 20 rats and then perform a BAL count in the intestine at 21 days, being in the study group with BAL at  $60 \times 10^{19}$  UFC / mL, while in the treatment with BAL plus yacon at  $25 \times 10^{24}$  UFC / mL and treatments of yacon and control at  $50 \times 10^{14}$  UFC / mL of BAL obtaining a weight gain in Rats in the study group of BAL plus yacon of 46 g, while with lactic bacteria was 24 g and 16 g in the control group and extract of yacon. Consequently, this research demonstrates that the daily intake of traditional fermented beverages favors the increase of *Lactobacillus* in the intestinal microbiota.

**Key words:** Lactic bacteria, probiotic capacity, yacon, chicha of molle.

### INTRODUCCIÓN

Por la reciente preocupación mundial sobre asuntos de salud y la alimentación, los alimentos funcionales tienen un papel importante en la industria alimentaria, por tanto, se necesita explorar procesos nuevos y poner énfasis en este tipo de industrias. Los alimentos fermentados como la chicha de molle contienen microorganismos como las bacterias lácticas, las cuales son consideradas como probióticos. Una bebida probiótica es definida como un suplemento microbiano, que tiene efectos benéficos mejorando el balance microbiano intestinal. El intestino cuenta con un sinnúmero de microorganismos presentes en la porción final del tracto gastrointestinal humano<sup>1</sup>.

En el intestino delgado la microbiota varía según el segmento intestinal, por sí misma no produce alteraciones, constituyendo un verdadero cultivo autorregulable. Asimismo, la

variación de estos microorganismos benéficos de nuestra microbiota intestinal pueden ocasionar infecciones persistentes en el tracto intestinal, que contribuye a la pérdida de una de las características funcionales más importantes para el control de la proliferación de la microbiota intestinal; así en la chicha de molle se encuentran microorganismos beneficiosos para el hombre, como las bacterias lácticas que modifican favorablemente el balance de la microbiota intestinal, favorecen una buena digestión, inhiben el crecimiento de ciertas bacterias patógenas, potencian la función inmunológica y aumentan la resistencia a las infecciones<sup>2</sup>.

Las personas con colonias intestinales de estas bacterias benéficas están mejor equipadas para combatir el crecimiento de las bacterias que causan enfermedades. Los lactobacilos y los bacilos bífidos mantienen un balance sano de la microbiota intestinal al producir compuestos orgánicos, como el ácido láctico, agua oxigenada y ácido acético, que aumentan la acidez intestinal e inhiben el desarrollo de muchos microorganismos nocivos debido a la producción de sustancias llamadas bacteriocinas, que funcionan como antibióticos naturales, matando a los microorganismos no deseados<sup>3</sup>.

Es fundamental la relación existente entre la microbiota intestinal y el estado de salud de las personas. Una mala alimentación produce una elevada presencia de sustancias perjudiciales, que al ser utilizadas por bacterias nocivas presentes en el intestino afectan la salud del receptor<sup>4</sup>.

En el intestino, tanto los microorganismos beneficiosos como aquellos potencialmente patógenos pueden competir por los mismos nutrientes para crecer y reproducirse. Por lo tanto, cuanto mayor es la población de las bacterias beneficiosas en el intestino, mayor será la competencia con los microorganismos patógenos<sup>4</sup>. El estudio tuvo como objetivos: aislar e identificar las bacterias lácticas aisladas de la chicha de molle, evaluar la capacidad probiótica *in vitro* de las bacterias lácticas aisladas de la chicha de molle y evaluar la capacidad probiótica *in vivo* de bacterias lácticas aisladas de la chicha de molle en *Ratus norvegicus* “rata” cepa Holtzman.

## PARTE EXPERIMENTAL

Las muestras estuvieron conformadas por 55 chichas de molle procedente de la provincia de Huanta del distrito de Luricocha comunidad rural Secella y de la provincia de Huamanga distrito de Ayacucho, Pacaycasa, anexo Ocopa; Tambillo, anexo Condaray, y distrito de Jesús Nazareno. Se desarrollaron las siguientes técnicas:

**Aislamiento directo de bacterias lácticas.-** Se aislaron bacterias provenientes de chicha de molle elaboradas de manera artesanal, para lo cual se tomó una asada de la muestra fermentada en Agar Lactobacilli, se sembró por estrías, posteriormente se incubó a 37 °C por 24 horas y finalmente las colonias se repicaron para el cepario<sup>5</sup>.

**Identificación de bacterias lácticas.-** Se evaluó las características microscópicas mediante la coloración de Gram, esta prueba se hizo a partir de un cultivo joven (18-24h) en Agar Lactobacilli<sup>5</sup>. Y para las pruebas bioquímicas se llevó a cabo la evaluación de la capacidad fermentativa con diferentes carbohidratos como: arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, rafibinosa, salicilina, sorbitol sacarosa, xilosa, almidón e inulina<sup>5</sup>.

### **Capacidad probiótica *in vitro***

**Crecimiento en disco de microorganismos.-** Se reactivó las cepas patógenas en Caldo Nutritivo (*Escherichia coli*, ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) y en Caldo Sabouroud (*Candida albicans* ATCC 90028) a 37°C por 14 horas. Asimismo, se reactivó las bacterias lácticas en Caldo Lactobacilli a 37 °C/ 14 h y se comparó con el tubo N° 2 de la escala de Mac Farland con 109 UFC/mL. Asimismo, se dispuso en placas petri con Agar Lactobacilli, en la que se realizaron con la ayuda de un sacabocado discos de 6mm de diámetro a partir de la placa con Medio Lactobacilli y se colocó en placas con Agar Müeller Hintong y Agar Nutritivo, luego con las cepas de bacterias lácticas reactivadas se colocó exactamente en el centro de cada disco 20µL de BAL reactivadas<sup>6</sup>.

**Prueba de antagonismo.-** Se sumergió un hisopo estéril en suspensión de células a partir de las cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* comparando con el tubo N° 2 de la Escala de Mac Farland, presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso del inóculo. Se inoculó en la superficie de la placa con Agar Müeller Hintong y Agar Nutritivo, estirando con el hisopo estéril en tres direcciones, para asegurar una distribución uniforme del inóculo, antes de colocar los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para eliminar el exceso de humedad superficial.

Así, se colocaron los discos sobre la superficie del Agar Müeller Hintong presionando suavemente sobre el disco para asegurar el contacto completo con la superficie del Agar. Se incubaron las placas en posición invertida a 37 °C por 24 horas para bacterias y 25 °C por 48 horas para levadura para finalmente medir los halos de inhibición<sup>6</sup>.

### **Tolerancia a condiciones gastrointestinales**

**Tolerancia a pH ácido.-** Se preparó tubos con Caldo Lactobacilli y se ajustó a pH 1,0, 1,5 y 2,0 con HCl 0,1 N luego se vertió el inóculo de las cepas BAL en tubos y se dejó en incubación a 37 °C por 24 horas, finalmente se observó el crecimiento por turbidez<sup>7</sup>.

**Tolerancia a extractos gástricos.-** Se reactivó las cepas BAL, luego se preparó extracto gástrico artificial, para lo cual se tomó 0,2g de NaCl y 0,32g de pepsina ajustando a pH final de 2,0 – 2,3 con HCl concentrado, se completó a 100mL con agua destilada estéril. Como control se ajustó extracto gástrico artificial a un pH de 6,5 -7,0 con NaOH 5N, luego se llevó

a esterilización, así mismo se vertió 1 mL de inóculo en 9 mL del extracto gástrico artificial pH 2,0 – 2,3 y pH 6,5 – 7,0 (control) y se incubó a 37 °C, luego de 24 horas se observó la viabilidad celular por turbidez<sup>7</sup>.

**Tolerancia a sales biliares.**- Se preparó bilis de buey al 0,05, 0,1, 0,15, 0,3 % p/v en tubos con Caldo Lactobacilli y se vertió 100 µL cepas BAL, se dejó en incubación a 37 °C por 24 horas se observó el crecimiento por turbidez<sup>7</sup>.

#### **Evaluación de la densidad poblacional in vivo de bacterias lácticas y cepas patógenas.**

Se utilizaron 20 ratas hembras adultas *Ratus norvegicus cepa* Holtzman de siete semanas de edad, procedentes del Instituto Nacional de Salud - Lima, cuyo peso corporal oscilaba entre 180-200 g al término de la cuarentena (7 días), durante la cual los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en  $20 \pm 2$  °C, la humedad entre  $60 \pm 10$  % y los ciclos de luz - oscuridad fueron de 12 horas. El alimento administrado a los animales durante el estudio fue pienso preparado en el laboratorio de biotecnología, constituido por 50 % de cereales (maíz, avena y arroz), 25 % de leguminosas (frijol y lentejas) y 25 % de frutos secos (almendras y pasas). El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum* y para cada tratamiento se utilizaron cuatro ratas. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio del Perú.

**Estandarización de la carga microbiana de bacterias lácticas.**- Para la estandarización de carga microbiana de BAL se reactivó las cepas patógenas y una cepa BAL escogida al azar, luego se verificó la turbidez con la escala de Mac Farland (tubo 2) con 109UFC/mL, para posteriormente realizar el recuento en placa.

**Evaluación in vivo de la densidad poblacional de bacterias lácticas.**- A cada uno de los animales de experimentación se le inoculó el probiótico diariamente. Para el tratamiento 1, se inoculó en proporción 1:1 de bacterias lácticas y extracto de yacón, respectivamente, para el tratamiento 2, 2 mL de bacterias lácticas, para el tratamiento 3, 2 mL de yacón y el tratamiento 4 (control) no se inoculó ni bacterias lácticas ni yacón. El diseño experimental constituido por:

**Tabla 1.** Diseño experimental

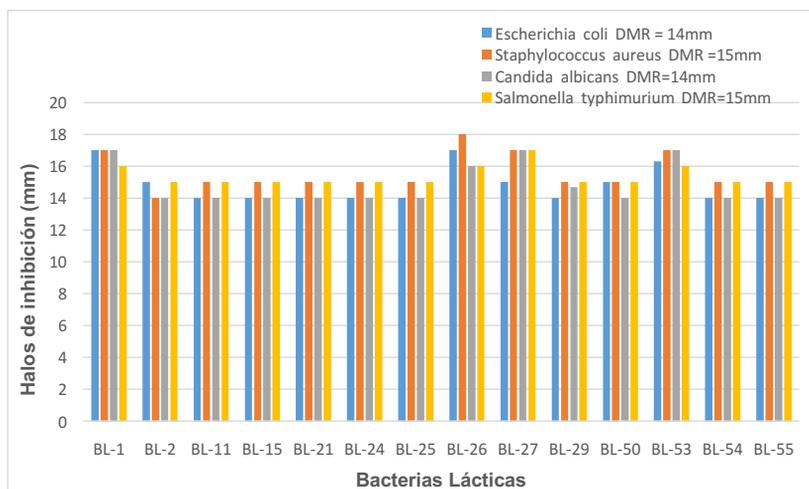
Nº	Tratamiento
1	4 ratas (yacón + BAL)
2	4 ratas (BAL)
3	4 ratas (yacón)
4	4 ratas (control)

**Sacrificio de animales.-** Todos los animales fueron sacrificados a los 21 días, por lo cual previamente fueron anestesiados con atmósfera de éter y luego sacrificados por dislocación cervical y, finalmente, se extrajo el intestino delgado al cual se realizó lavados con agua peptonada al 1 %. Luego se realizó diluciones hasta  $10^{-20}$  y se sembró por incorporación las dos últimas diluciones por duplicado en Agar Lactobacilli e incubó a 37 °C por 24 horas y se realizó finalmente el recuento en placa.

**Análisis estadístico.-** Se realizó la prueba de ANOVA con un nivel de significancia de 5 % la cual contribuyó para la identificación de diferencia de densidades poblacionales de BAL para ello se empleó el software estadístico SPSS 23.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se observa la formación de halos de inhibición producidas por bacterias lácticas (BAL) frente a cepas patógenas como *Escherichia coli*, y *Salmonella typhimurium* (Gram negativas) y *Staphylococcus aureus* (Gram positivas) y a *Candida albicans* (levadura), reportando que las 55 cepas de BAL aisladas producen sustancias inhibitorias frente a microorganismos patógenos, siendo el diámetro mínimo resistente 14 mm, 15 mm, 15 mm y 14 mm, respectivamente, observándose que 14 cepas producen halos de inhibición frente a las cuatro cepas patógenas, deduciendo que estas cepas producen bacteriocinas de amplio espectro, visualizando que las cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus maltaromicus* presentan mayor capacidad de inhibición en comparación con las cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, resultado similar en el estudio de la capacidad antagonica de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, siendo las especies de *Lactobacillus plantarum* con mayor capacidad antagonica en comparación a *Leuconostoc mesenteroides*<sup>5</sup>. Para determinar la capacidad probiótica de una cepa, esta debe cumplir con la producción de sustancias antimicrobianas como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas; estos compuestos reducen el número de células patógenas, afectando el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas, en este sentido se llevó a cabo el estudio con la finalidad de evidenciar la posible capacidad inhibidora de las cepas aisladas de la chicha de molle y para realizar la selección de cepas, se basó en que las cepas fueran activas frente a cuatro microorganismos patógenos los cuales deben evidenciarse mediante la producción de sustancias inhibitorias. Entre las especies de *Lactobacillus* que desempeñan un papel fundamental en el tracto digestivo podemos citar a *Lactobacillus plantarum* las cuales se menciona en la investigación de la actividad inhibitoria de los mismos, frente a cepas de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* demuestra que *Lactobacillus plantarum* producen un sistema inhibitorio y acción antagonista contra los microorganismos patógenos antes mencionados<sup>9</sup>, estos resultados coinciden con la producción de bacteriocinas producidas por las cepas BAL aisladas de chicha de molle.



Codificación: BL-1,2,11,15,21,24,25,26,27,29,54,55 = *Lactobacillus plantarum*.  
 BL-26,50,53 = *Lactobacillus maltaromicus*.

**Figura 1.** Formación de halos de inhibición producidas por bacterias lácticas frente a cepas patógenas.

Un requisito importante para determinar la utilización de los *Lactobacillus* como probiótico, es que las cepas sean capaces de adherirse a las células intestinales ya que constituye un pre-requisito para la colonización, dichos *Lactobacillus* deben soportar las barreras potenciales tales como pH del estómago, presencia de bilis y las interacciones con otros microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal, por tanto, se requieren cepas ácido-tolerantes así como tolerantes a extractos gástricos y fluidos duodenales<sup>5</sup>.

Así, para evaluar la capacidad probiótica *in vitro* se realizaron pruebas de tolerancia gastrointestinal, en las cuales se evaluó el crecimiento de BAL a diferentes concentraciones de pH, concentraciones de bilis y extracto gástrico artificial, experimentadas a las 55 cepas. En la tabla 2 se observa la capacidad de tolerar estas condiciones, para ello las bacterias lácticas requieren complejos de proteínas y carbohidratos para adherirse a las células intestinales. Para algunas cepas, un material tipo polisacárido que facilita la unión, mientras que otras cepas involucran complejos de lípidos y proteínas en este mecanismo<sup>10, 11</sup>.

A partir de los estudios realizados de las cepas de *Lactobacillus* provocan un adecuado efecto probiótico en el intestino humano, dado que son capaces de resistir a estas condiciones. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio, resultando de ello que 25 cepas aisladas de chicha de molle tienen capacidad de tolerar condiciones gastrointestinal *in vitro*<sup>12</sup>.

**Tabla 2.** Tolerancia gastrointestinal *in vitro* de bacterias lácticas asiladas de chicha de molle.

CEPAS	pH				Bilis (%)			Extracto Gástrico	Tolerancia
	1.0	1.5	2.0	0.05	0.10	0.15	0.30		
BL-1	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-2	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-3	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-6	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-7	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-8	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-11	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-12	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-15	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-21	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-23	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-24	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-25	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-26	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-44	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-23	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-24	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-25	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-26	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-44	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-48	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-50	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-53	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-54	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-55	√	√	√	√	√	√	√	√	SI

BL = Bacterias Lácticas

En la tabla 3 se reporta la carga microbiana de bacterias lácticas halladas en los intestinos de los animales de experimentación que son muy variables, en el cual se evidencia que las bacterias lácticas son capaces de adherirse al intestino, existiendo mayor número de carga microbiana en los tratamientos de las cuatro cepas más la utilización del yacón, esto debido a la presencia del prebiótico el cual cumple el papel de nutriente para los probióticos, en base a las cuatro cepas experimentales no existe diferencia en la carga microbiana obteniéndose una carga microbiana de  $25 \times 10^{24}$  UFC/mL en el grupo de estudio con BAL más yacón, mientras que en el tratamiento con BAL  $60 \times 10^{19}$  UFC/mL, de ello podemos mencionar que las cuatro cepas probióticas tienen la misma capacidad de adherencia al intestino, en cambio en el grupo de estudio, en los cuales se experimentó independientemente con el yacón y el grupo control reportan una carga de  $50 \times 10^{14}$  UFC/mL, en base a ello se observa un incremento de  $10 \times 10^5$  UFC/mL de BAL con respecto a la utilización de BAL y  $25 \times 10^{10}$  UFC/mL con BAL más yacón. Siendo el yacón, condicionante para una mayor densidad poblacional de las cepas lácticas, debido a la presencia de fructooligosacáridos como fuente de carbono estimulando selectivamente al crecimiento de microorganismos probióticos<sup>8</sup>, en el estudio de la capacidad prebiótica de *Smallantus sonchifolia* en *Rattus norvegicus*, menciona que los prebióticos como el yacón contienen fructooligosacáridos que estimulan el crecimiento de número de

UFC de *Lactobacillus*. En consecuencia, podemos indicar que administrar una mezcla de una cepa BAL con el extracto de yacón administrado en proporción 1:1 determinar un grado de adhesión notable y que facilita el desplazamiento de bacterias lácticas en el tracto digestivo de los individuos en experimentación.

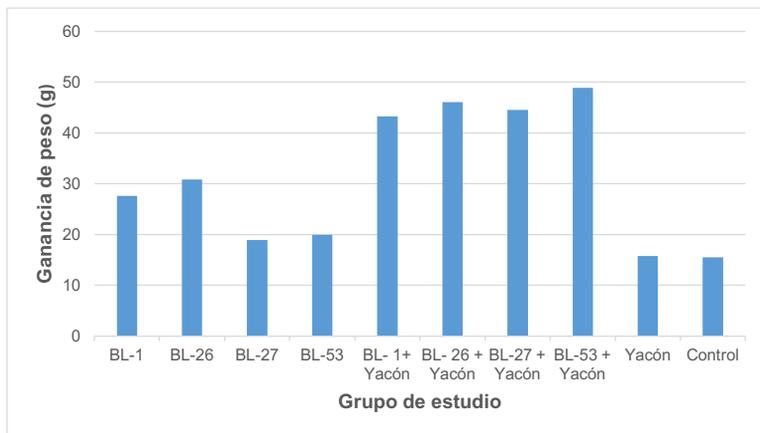
**Tabla 3.** Densidad poblacional de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle evaluadas en el intestino de *Rattus norvegicus* “rata” a los 21 días administrado.

Grupo de estudio	UFC/mL
BL-1	60x 10 <sup>19</sup>
BL-26	50x 10 <sup>19</sup>
BL-27	60x 10 <sup>19</sup>
BL-53	70x 10 <sup>19</sup>
BL-1+ Yacón	20x 10 <sup>24</sup>
BL-26 + Yacón	30 x 10 <sup>24</sup>
BL-27 + Yacón	20 x 10 <sup>24</sup>
BL-53 + Yacón	30 x 10 <sup>24</sup>
Yacón	50 x 10 <sup>14</sup>
Control	50 x 10 <sup>14</sup>

Codificación: BL-1 = *Lactobacillus plantarum*, BL-26 = *Lactobacillus maltaromicus*  
BL-27 = *Lactobacillus plantarum* y BL-53 = *Lactobacillus maltaromicus*

En base a ello se seleccionó cuatro cepas BAL con mayor diámetro de inhibición frente a microorganismos patógenos y tolerantes a condiciones gastrointestinales, siendo las seleccionadas BL-1 de la especie *Lactobacillus plantarum*, BL-26 de la especie *Lactobacillus maltaromicus*, BL-27 *Lactobacillus plantarum* y BL-53 de la especie *Lactobacillus maltaromicus* a las cuales se evaluaron la capacidad probiótica *in vivo*.

Para la evaluación *in vivo* de la capacidad probiótica de cepas se administró bacterias lácticas a 20 animales de experimentación (*Rattus norvegicus*) del cual podemos destacar que no se observaron efectos negativos ni en el comportamiento ni en el bienestar de las 20 ratas hembras a lo largo de todo el estudio realizado. En la figura 2, observamos los resultados de la aplicación de los tratamientos en cuanto a la ganancia de peso de ratas, encontrándose que las ratas que recibieron bacterias lácticas más extracto de yacón obtuvieron 46 gr de ganancia de peso mientras que en la ingesta de BAL se obtuvo 24 gr y 16 gr de ganancia de peso en el grupo control y extracto de yacón, de ello deducimos que las ratas que recibieron bacterias lácticas más extracto de yacón lograron mayores ganancias en peso a comparación con los que no recibieron el tratamiento, debido a la mayor asimilación de nutrientes y ausencia de enfermedades e infecciones gástricas durante el tiempo de estudio. El mayor incremento de peso puede ser atribuido a un mejor estado físico en las ratas, como lo reportan en el estudio sobre el efecto de bacterias probióticas en animales de experimentación en el cual estableció, que la ganancia diaria de peso en animales influyen factores como la ingesta de bacterias probióticas, estimulando su resistencia a microorganismos patógenos así como activando su respuesta inmune<sup>13</sup>.



**Figura 2.** Ganancia de peso de *Rattus norvegicus* “rata” sometidas a cuatro cepas de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle.

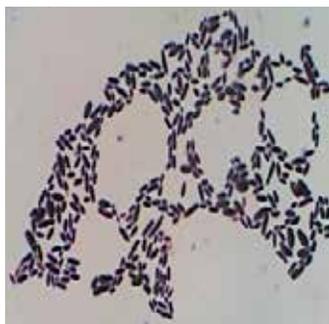


Bacteria Láctica BL-26



Bacteria Láctica BL-1

**Figura 3.** Características Macroscópicas en Agar Extracto de Tomate



Bacteria Láctica BL-26



Bacteria Láctica BL-1

**Figura 4.** Características Microscópicas (100X)

## CONCLUSIONES

1. Se aisló e identificó 55 cepas nativas de bacterias lácticas de chicha de molle, siendo identificadas las especies: *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus maltaromicus*.
2. En la capacidad probiótica *in vitro*, se obtuvo que 14 cepas BAL aisladas producen sustancias inhibitorias de amplio espectro frente a microorganismos patógenos y 25 cepas BAL resistentes a condiciones gastrointestinales.
3. En la capacidad probiótica *in vivo*, se consiguió que en el tratamiento con bacterias lácticas más extracto de yacón se obtuvo  $25 \times 10^{24}$  UFC/mL de BAL, comportándose el yacón como un prebiótico.
4. Se obtuvo 46 g de ganancia de peso en las ratas en el tratamiento de BAL más extracto de yacón.

## AGRADECIMIENTO

Las autoras agradecen el apoyo en el financiamiento para la ejecución de la investigación a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Icaza-Chávez M. E. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. Rev Gastroenterol Mex. 2013; 78(4): 240-248.
2. Sebastián JJ. Revisión del papel de los probióticos en patología gastrointestinal del adulto. Gastroenterol Hepatol. 2017; 40: 417-429.
3. Rajput R, Li W. Potential role of probiotics in mechanism of intestinal immunity. Pak Vet J. 2012; 32(3): 303-308.
4. Sánchez R, Omura M, Lucas A, Pérez T, Llanes M, De Luce S. Cepas de *Lactobacillus spp.* con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. Rev Salud Anim. 2015; 37(2): 94-104.
5. García-Godos P. Evaluación de bacterias lácticas con capacidad antagonica frente a cepas patógenas aislada a partir de chicha de molle. Presentado en VII Congreso Nacional de Biología. 2006; Ayacucho, Perú.
6. Sacsquisque R, Velásquez J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2002.
7. Villalobos R, Saldivar S, Moreno A. Implante histológico experimental de *Trichinella spiralis* en *Rattus norvegicus* “rata”. Boletín Lima. 2008; 100(5):14-16.
8. Flores M. Capacidad prebiótica de *Smallanthus sanchifolia* “yacón” en *Rattus norvegicus* “rata”. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Huamanga: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2008.

9. Delao N. Efecto de fructooligosacáridos de *Cynara scolymus* L. “alcachofa” en la producción de bacteriocinas por *Lactobacillus spp.* [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Lima: UNMSM; 2016.
10. Brunce O. Inocuidad, prevención y riesgos de los probióticos. Rev Chil Pediatr. 2017; 88 (4): 534- 540.
11. Jurado H, Orbes A, Mesías L. Evaluación *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* con características probióticas mediante química sanguínea, inmunohistoquímica y microscopía electrónica en *Cavia porcellus*. Rev Bio Agro. 2017; 15 (2):11-21.
12. Fujisawa N. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. FEMS Microbiol Lett. 2008; 4(2): 5-7.
13. Fox S. Probiotics: Intestinal inoculants for production animal. Vet Med. 2007; 12(83): 806-818.

## EFEECTO TÓXICO Y ECOTOXICOLÓGICO DE ARENAS NEGRAS DE LA MINERÍA ARTESANAL EN MADRE DE DIOS

Elsa Huamán Paredes<sup>a</sup>, Denis Vicuña Puente<sup>b</sup>, Lizardo Visitación Figueroa<sup>a</sup>,  
Lisveth Flores del Pino<sup>a</sup>

### RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto tóxico y ecotoxicológico de arenas negras (ANM) provenientes de la extracción artesanal de oro, en el departamento de Madre de Dios. Para evaluar el efecto tóxico se usó el test "Toxicity Characteristic Leaching Procedure" (TCLP) y con los lixiviados se hicieron pruebas de ecotoxicidad agudas según el protocolo de la EPA 600/3-88/029 usando microorganismos de prueba, neonatos de *Daphnia Magna*, con 24 horas de nacidos y en semillas de *Lactuca sativa*. La cuantificación de mercurio total en las muestras de ANM y en los lixiviados se realizó mediante Espectroscopia de Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente. Los valores obtenidos de mercurio total en las muestras de ANM estuvieron en el rango de 0,1 y > 275 mg/kg de arena negra, lo que indica que superan en 1000 veces los valores de fondo. En los lixiviados la concentración de mercurio total estuvo en el rango de 0,001 y >2,75 mg/L, algunos de estos valores superan los límites máximos permisibles (0,2 mg/L) representado un potencial tóxico para la salud humana. En el caso del efecto ecotóxico sobre las *daphnias*, se encontró que el metal mercurio en interacción con otros metales, como el aluminio, podrían ocasionar un efecto letal. Sobre la *Lactuca sativa*, se determinó mayor efecto ecotóxico sobre la radícula.

**Palabras clave:** Arenas negras, mercurio, efectos tóxicos y ecotoxicológicos.

## TOXIC AND ECOTOXICOLOGICAL EFFECT OF BLACK SAND OF ARTISANAL MINING IN MADRE DE DIOS

### ABSTRACT

In this work the toxic and ecotoxicological effect of black sand (ANM) from artisanal gold extraction in the department of Madre de Dios was studied. Toxicity Characteristic Leaching Procedure (TCLP) was used to evaluate the toxic effect and with the leachates,

---

<sup>a</sup> Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental, Departamento Académico de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Perú.  
ehuaman@lamolina.edu.pe

<sup>b</sup> Tower and Tower S.A.Av. Portillo Grande Mz. G Lote 10. Lurín, Lima - Perú.

acute ecotoxicity tests were performed according to EPA protocol 600 / 3-88 / 029 using test microorganisms, *Daphnia Magna* neonates, with 24 hours of birth and in seeds of *Lactuca Sativa*. The quantification of total mercury in ANM samples and in leachates was performed by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy. The values obtained of total mercury in the ANM samples were in the range of 0.1 and > 275 mg/kg of black sand indicating that they exceed the background values by 1000 times. In the leachates the total mercury concentration was in the range of 0.001 and > 2.75 mg/L, some of these values exceed the maximum permissible limits (0.2 mg/L) representing a toxic potential for human health. In the case of the ecotoxic effect on *daphnia*, it was found that metal mercury in interaction with other metals, such as aluminum, could cause a lethal effect. On the *Lactuca Sativa*, a greater ecotoxic effect on radicle was determined.

**Key words:** Black sand, mercury, toxic and ecotoxicological effect

## INTRODUCCIÓN

El proceso de extracción de oro en la región de Madre de Dios - Perú, se realiza en forma artesanal en las cuencas de los ríos Madre de Dios, Inambari, Tambopata, Huaypetue entre otros. Por lo general, para la extracción se utiliza el método gravimétrico, en este método el material de suelo extraído pasa por un tamiz, separando el material grueso constituido por grava, luego el material separado pasa a unos jigs (lavador por sacudidas) y por vibración se logra separar el material pesado denominado arenas negras de Madre de Dios, al que llamaremos ANM (Pastor, 1991). Las ANM son mezcladas con el mercurio para formar la amalgama entre el mercurio y el oro, el mercurio amalgamado con el oro es retirado, quedando las ANM residuales que contienen cantidades variables de mercurio residual y son dispuestas de diversas formas, entre adecuadas e inadecuadas (MINAM, 2011).

Las arenas negras, en general, tienen alta densidad, están conformadas por material pesado que contiene diversos elementos metálicos como el titanio, hierro, aluminio, manganeso, magnesio y calcio (Abdel-Karim *et al.*, 2016), adicionalmente en el caso de ANM el mercurio es el elemento más abundante introducido en forma intencional.

Las concentraciones altas de los elementos prioritarios (Sb, As, Be, Cd, Cr, Cu, Pb, Ag, Ni, Se, Ag, Tl, Zn) según EPA (USEPA 2014) en lixiviados de ANM categorizan a este residuo como residuo peligroso que debe ser manejado y dispuesto según la normativa de residuos sólidos D.L N° 1278, Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos.

La presencia de elementos metálicos potencialmente tóxicos, presentes en las ANM, pueden tener efectos tóxicos cuando son liberados en el ambiente sustancias como el mercurio, pueden generar ecotoxicidad sobre semillas como la de *Lactuca sativa*, generando formación de fitoquelatinas que restringen el ingreso de nutrientes por la raíz (Cui *et al.*, 2014), por otro lado, la presencia de aluminio en los lixiviados puede ser muy tóxico para los organismos acuáticos como las *daphnias*, debido a la precipitación en las agallas (Quiroz-Vázquez *et al.*, 2010; Poléo *et al.*, 1994).

En el Perú son limitados los trabajos realizados sobre arenas negras de la minería de oro (Gómez, 2012; Pastor *et al.*, 1991), motivo por el cual nuestro objetivo para la presente investigación fue evaluar el efecto tóxico y ecotoxicológico de las arenas negras para poder definir su manejo y método de disposición final.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Toma de muestra

Las muestras se obtuvieron de forma manual en los lugares de disposición de las arenas negras, luego del proceso de extracción de oro de la minería artesanal en las cercanías del río Madre de Dios y los ríos tributarios del mismo, tal como se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Distribución espacial de los puntos de muestreo.  
DATUM: UTM WGS84 Zona 19S

**Tabla 1.** Puntos de muestreo

Estación	Cuenca	Coordenadas UTM		Condición de la muestra
		Este	Norte	
A1	Colorado	340133	8604775	Seca
				Fresca
MA	Inambari	351756	8550941	Seca
				Fresca
3F	Madre de Dios	459808	8611242	Fresca
PL	Madre de Dios	426604	8593687	Seca
				Fresca
BM	Bajo Madre de Dios	491616	8609772	Seca
CS	Tambopata - Inambari	392682	8574898	Seca
HU	Huaypetue	333170	8562033	Seca
				Fresca

### **Determinación de metales en las arenas negras**

La determinación de metales en los residuos de ANM y en los lixiviados se realizó por Espectrometría de Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente. EPA - Método 200.7 Revisión 4.4.

### **Determinación del efecto tóxico y ecotoxicológico**

La determinación del efecto tóxico de las ANM se realizó mediante el método EPA 1311 "Toxicity Characteristic Leaching Procedure" (TCLP) utilizando una dilución del residuo 20:1 con un extractante a pH = 2.2.

La determinación del efecto ecotoxicológico en los lixiviados de las muestras se realizó utilizando los lineamientos del protocolo de la EPA 600/3-88/029 para test agudos. También se utilizó como organismos de prueba neonatos de *Daphnia magna* con 24 horas de nacidos, evaluando la concentración que ocasiona un efecto tóxico al 50 % de la población ( $CE_{50}$ , muerte) durante 24 horas y con semillas de *Lactuca sativa* evaluando efectos sobre la raíz y la germinación.

Los parámetros ecotoxicológicos fueron transformados en unidades tóxicas (UT), mediante el uso de la fórmula de  $UT = \frac{C}{CE_x}$ , (US EPA 1992) donde C es la concentración del residuo máxima utilizada (en este caso 100 %) y  $CE_x$  es la concentración que ocasiona efecto. En el trabajo se utilizó  $CE_{50}$  efecto al 50 % de la población.

### **Relación entre metales y TCLP en las matrices evaluadas**

Se elaboró la variación del mercurio total en ANM en comparación con la concentración característica de los lixiviados de ANM.

### **Correlación entre metales y ensayos ecotoxicológicos en las matrices evaluadas**

Se elaboró una matriz de correlación de Pearson entre los elementos metálicos traza presentes en las ANM y los ensayos ecotoxicológicos evaluados en los lixiviados de ANM obtenidos por TCLP.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Determinación de metales en las arenas negras**

En la figura 2 se muestra las concentraciones de mercurio presentes en las diferentes estaciones de muestreo y se observa que dos de ellas sobrepasan el nivel de 260mg/kg, según la Norma de la USEPA, lo que indica claramente el aporte antropogénico de mercurio en las ANM, ratificando lo afirmado por Álvarez *et al.* (MINAM 2011).

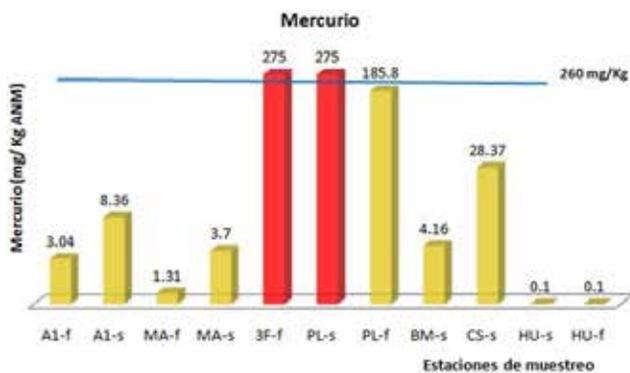


Figura 2. Concentración de mercurio en las muestras de cada estación.

En las muestras analizadas, además del metal mercurio, la presencia del metal aluminio estuvo en mayor proporción frente a otros metales de acuerdo a la figura 3.

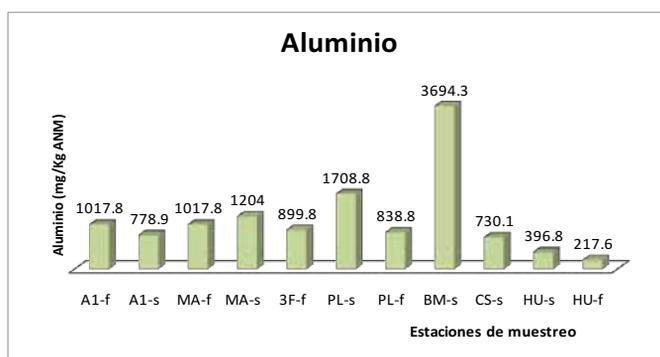
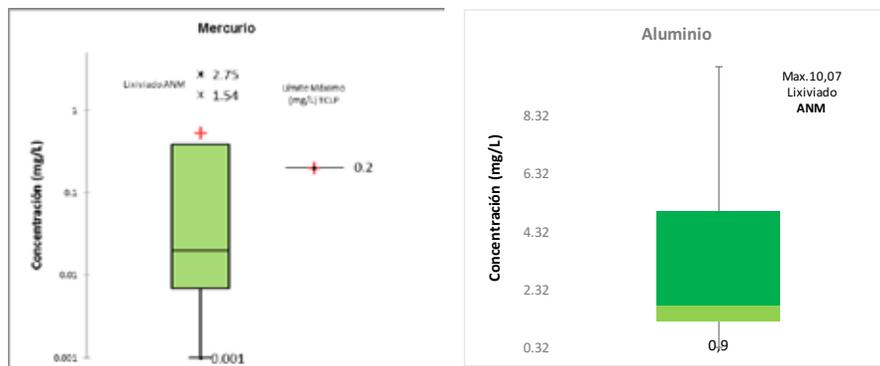


Figura 3. Concentración de aluminio en las muestras

### Efecto tóxico en las muestras de ANM

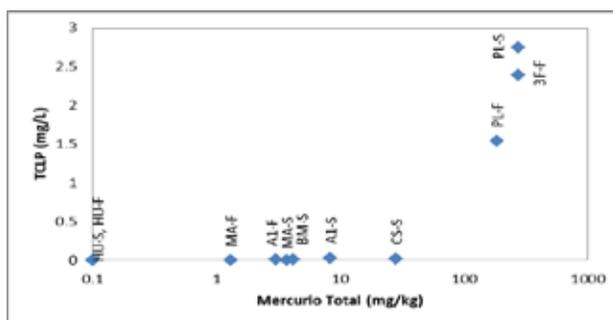
En los lixiviados, según el método TCLP, el mercurio en la muestra PL-s supera el límite máximo permisible y para el aluminio en la muestra BM-s dio un valor máximo de 10,07mg/L que se relaciona con la concentración encontrada en el residuo de ANM. En la figura 4 del diagrama de caja y bigotes se evidencia la presencia de estos metales en los residuos de ANM, catalogando a estas muestras como residuos tóxicos que deben ser manejados y dispuestos como residuos peligrosos.



**Figura 4.** Concentración de mercurio y aluminio en lixiviados de ANM

### Correlación entre metal y TCLP en las matrices evaluadas

Como se observa en la figura 5, en el test de TCLP, muestras con concentraciones de mercurio total en las ANM por debajo de 28,4 mg/kg presentan contenidos de mercurio en el lixiviado menor a 0,03 mg/L. Cuando la concentración de mercurio se incrementa en las ANM, las concentraciones en el lixiviado se incrementan en forma proporcional a la concentración total. La mayor concentración de mercurio en el lixiviado fue mayor a 2,75 mg/L en la muestra 3F-F esta muestra también tiene la mayor concentración de mercurio total en la ANM, resultados con tendencias similares han sido encontrados en otros estudios realizados en China (Yang *et al.*, 2016).



**Figura 5.** Variación del mercurio total en ANM en comparación con la concentración característica en los lixiviados.

### Caracterización ecotoxicológica en *Daphnia magna* y *Lactuca sativa*

En la tabla 2 se presentan los resultados ecotoxicológicos de los lixiviados de ANM. Los valores de ecotoxicidad de los lixiviados fueron convertidos en valores de unidad tóxica (UT) (US EPA, 1992), con la finalidad de poder tener resultados en valores adimensionales que son aditivos y comparables. Los valores de las UT fueron comparados con el promedio

de toxicidad y utilizando una escala arbitraria (Manusadzianas, 2003; Persoone, 1993), se clasificó la toxicidad de los residuos como: sin toxicidad (st) < 1 UT, tóxico (t) 1 – 10 UT, muy tóxico (mt) 11 – 100 UT, extremadamente tóxico (et) > 100 UT. Como se observa en la tabla 2, los resultados de las ANM tomaron valores entre muy tóxico a extremadamente tóxicos.

**Tabla 2.** Unidades tóxicas de los lixiviados de ANM.

Muestra	EC50 (%)				UT				UT Promedio
	<i>Daphnia magna</i>		<i>Lactuca Sativa</i>		<i>Daphnia magna</i>		<i>Lactuca sativa</i>		
	24 h	48 h	Radícula	Germinación	24 h	48 h	Radícula	Germinación	
A1-F	2,69	1,39	8,20	14,47	37,2	72,0	12,2	6,9	32,1 (mt)
A1-S	1,07	0,25	8,30	16,54	93,2	408,2	12,0	6,0	129,9 (et)
MA-F	0,51	0,15	8,73	16,37	196,9	653,6	11,5	6,1	217,0 (et)
MA-S	0,56	0,18	8,10	16,60	178,6	571,4	12,3	6,0	192,1(et)
3F-F	0,73	0,21	11,99	26,41	136,6	473,9	8,3	3,8	155,7 (et)
PL-F	1,95	1,10	6,30	18,37	51,3	90,9	15,9	5,4	40,9 (mt)
PL-S	1,72	0,58	5,71	14,08	58,1	173,9	17,5	7,1	64,2 (mt)
BM-S	1,87	0,95	--	--	53,4	105,5	--	--	79,5 (mt)
CS-S	1,06	0,29	11,41	18,39	94,3	348,4	8,8	5,4	114,2 (et)

En la tabla 3 se correlaciona los resultados ecotoxicológicos en UT con las concentraciones de mercurio y aluminio presentes en las ANM. Se observa que la concentración de aluminio en las ANM tiene una buena correlación con la toxicidad en *Daphnia magna* tanto a 24 h como a 48 h. Concentraciones altas de aluminio en soluciones ácidas como los lixiviados de las ANM son muy tóxicas para *Daphnia magna*, principalmente debido a la precipitación del aluminio en las agallas de los micro crustáceos que actúan como superficies de nucleación donde se polimeriza el aluminio (Quiroz-Vázquez et al., 2010; Poléo et al., 1994), esto puede producir la obstrucción de los espacios interlaminares.

**Tabla 3.** Coeficientes de correlación de Pearson en Unidades Toxicas (UT)

Variables	Metales en ANM		<i>Daphnia magna</i>		<i>Lactuca sativa</i>	
	Al	Hg	24 h	48 h	Radícula	Germinación
Al	<b>1</b>	0,169	<b>0,630</b>	<b>0,536</b>	0,165	-0,056
Hg		<b>1</b>	-0,480	-0,532	<b>0,810</b>	0,270
D 24 h			<b>1</b>	0,970	-0,450	-0,316
D 48 h				<b>1</b>	-0,533	-0,340
LS Radícula					<b>1</b>	0,634
LS Germinación						<b>1</b>

La correlación entre la concentración de mercurio y la ecotoxicidad en *Lactuca sativa* a nivel de radícula en lixiviados de ANM fue muy buena, esto se debe a que las plantas dificultan el ingreso del mercurio formando complejos de fitoquelatinas con el metal,(Hg-PC) a nivel de la raíz como mecanismo de defensa (Cui et al., 2014), siendo la raíz la que presenta la mejor respuesta ecotoxicológica al mercurio.

## CONCLUSIONES

Los resultados de análisis de los residuos de arenas negras de Madre de Dios (ANM) presentan contenidos variables de mercurio (0,1 – >275 mg/kg ANM).

Mediante ensayos de toxicidad como el TCLP se ha determinado que las muestras de arenas negras, debido al contenido de mercurio, son residuos peligrosos por superar los valores límite para este metal (0,2mg/L).

Las ANM podrían ser consideradas como muy tóxicas a extremadamente tóxicas en los organismos como las *daphnias* y *Lactuca sativa*. Principalmente, es el aluminio en copresencia con el mercurio representando toxicidad para las *daphnias*.

Los residuos de arenas negras son residuos peligrosos que deben ser manejados adecuadamente y dispuestos en rellenos de seguridad, conforme establece la legislación peruana.

Los compuestos alquilmércurio no han sido considerados en este documento sino la cuantificación de mercurio total en las arenas negras de Madre de Dios. Es así que el estudio de especies metiladas o etiladas de mercurio amerita otro análisis.

## AGRADECIMIENTO

El agradecimiento para la realización del proyecto, para la Empresa Tower & Tower S.A, según el proyecto PITEI-1-P-117-043-14 financiado por FINCyT, aporte propio, y de la Universidad Nacional Agraria La Molina, mediante el uso de laboratorios y equipo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Manusadzianas L, Balkelyte L, Sadauskas K, Blinova I, Pöllumaa L, Kahru A. Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquat Toxicol.* 2003; 63: 27-41.
2. Persoone G, Goyvaerts M, Janssen C, De Coen W, Vangheluwe M. Cost effective acute hazard monitoring of polluted waters and waste dumps with the aid of Tox kits, Final Report. Commission of European Communities. Contract ACE 89/BE 2/D3. 1993. p. 600.
3. Quiroz-Vázquez P, Sigee DC, White KN. Bioavailability and toxicity of aluminium in a model planktonic food chain (*Chlamydomonas*–*Daphnia*) at neutral pH. *Limnologia.* 2010; 40: 269-277.
4. Poléo ABS, Lydersen E, Rosseland BO, Kroglund F, Salbu B, Vogt RD, et al. Increased mortality of fish due to changing Al-chemistry of mixing zones between limed streams and acidic tributaries. *Water Air Soil Pollut.* 1994, 75: 339-351.

5. Gómez CF. Evaluación de escenarios alternativos en sistemas sociales ecológicos afectados por la minería aluvial en Madre de Dios. [Tesis para optar el grado de Magíster of Science]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2014.
6. Cui L, Feng X, Lin C, Wang X, Meng B, Wang H. Accumulation and translocation of 198Hg in four crop species. *Environ Toxicol Chem.* 2014; 33(2): 334–340.
7. Yang M, Wang S, Zhang L, Wu Q, Wang F, Hui M, et al. Mercury emission and speciation from industrial gold production using roasting process. *J Geochem Explor.* 2016; 117:72-77.
8. Taylor SR. Abundance of chemical elements in the continental crust: a new table. *Geochim Cosmochim Acta.* 1964; 28(8):1273 –1285.
9. Pastor O. Gisements alluviaux d'or, 1991, 1-5. Pastor O. El oro en la cuenca del río Madre de Dios – Perú. En: Héral G, Fornari M. Simposio Internacional sobre Yacimientos Aluviales de Oro; 1-5 jun 1991; La Paz. La Paz: Orstom; 1991. P. 103-113.
10. Brack A, Ipenza C, Alvarez J, Sotero V; Minería Aurífera en Madre de Dios y Contaminación con Mercurio - Una Bomba de Tiempo. Lima: Ministerio del Ambiente; 2011.
11. Abdel-Karim AM, Zaid SM, Moustafa MI, Barakat MG. Mineralogy, chemistry and radioactivity of the heavy minerals in the black sands, along the northern coast of Egypt. *J Afr Earth Sci.* 2016; 123: 10-20.
12. USEPA. Priority Pollutant List. [Internet]. 2014, United State Environmental Protection Agency. [Revisado jun 2017]. Disponible en: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>
13. USEPA. Introduction to Water Quality-Based Toxics Control for the NPDES Program. Washington: USEPA; 1992.
14. Coelho JP, Monteiro RJR, Catry T, Lourenco PM, Catry P, Regalla A. et al. Estimation of mercury background values in sediment and biota of the Bijagós archipelago, Guinea-Bissau. *Mar Pollut Bull.* 2016; 111: 488-492.
15. Nesbitt HW, Young GM, Bosman SA. Major and trace element geochemistry and genesis of supracrustal rocks of the North Spirit Lake Greenstone belt, NW Ontario, Canada. *Precambr Res.* 2009; 174: 16-34.
16. Park JW, Hu Z, Gao S, Campbell IH, Gong H. Platinum group element abundances in the upper continental crust revisited – New constraints from analyses of Chinese loess. *Geochim Cosmochim Acta.* 2012; 93: 63-76.
17. Ji X, Hu W, Cheng J, Yuan T, Fang X, Qu L, et al. Oxidative stress on domestic ducks (Shaoxing duck) chronically exposed in a Mercury–Selenium coexisting mining area in China. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2005; 64: 171-177.
18. Wang W, Hao W, Bian Z, Lei S, Wang X, Sang S, et al. Effect of coal mining activities on the environment of *Tetraena mongolica* in Wuhai, Inner Mongolia, China—A geochemical perspective. *Int J Coal Geol.* 2014; 132: 94-102.

## EFFECTOS DE LIOFILIZACIÓN SOBRE COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN PULPA DE CUATRO VARIETADES DE *Mangifera indica*

\*Felipe Surco-Laos<sup>1</sup>, Rocío Tipiana<sup>1</sup>, Ysabel Torres<sup>1</sup>, Manuel Valle, Juan Panay<sup>1</sup>.

### RESUMEN

El mango, *Mangifera indica* L., es una de las frutas tropicales que destaca por su particular sabor y aroma, tiene amplia aceptación. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la liofilización sobre la pulpa de cuatro variedades de mango: Chato, Rosado, Carne y Chupar. Se efectuó un análisis químico bromatológico por métodos oficiales (AOAC, FAO) y la capacidad antioxidante por DPPH antes y post tratamiento. No se encontró diferencias significativas entre las variedades de mangos salvo en el contenido de vitamina C (rosado y carne ~50 % +), y carotenoides (rosado ~70 % +); el procesamiento afectó la acidez con un incremento de 250 %, una disminución de carotenoides totales (27- 42 %) y actividad antioxidante (~50 %).

**Palabras clave:** Mango, liofilización, composición química, actividad antioxidante.

## LYOPHILIZATION EFFECTS ON CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN PULP OF FOUR VARIETIES *Mangifera indica*

### ABSTRAC

The mango, *Mangifera indica* L., is a tropical fruit that stands out for its particular flavor and aroma, is widely accepted. In this paper the effect of lyophilization on the pulp four mango varieties was evaluated: Chato, Pink, Meat and Suck. Bromatological chemical analysis by official methods (AOAC, FAO) and antioxidant capacity by DPPH before and after treatment was performed. No significant differences between varieties of mangos, except vitamin C (pink and meat ~ 50 % +) and carotenoids (Pink ~ 70 % +) was found; the processing affected the acidity with an increase of 250 %, a decrease of total carotenoids (27- 42 %) and antioxidant activity (~ 50 %).

**Key words:** Mango, lyophilization, chemical composition, antioxidant activity.

---

<sup>1</sup>Facultad de Farmacia y Bioquímica UNICA. Ciudad Universitaria Ica.

\*felipesurco@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) se encuentra entre las frutas preferidas por la población en el país, entre las variedades iqueñas tenemos al *mango rosado*, *mango chato*, *mango de carne*, *mango de chupar*, variedades no injertadas o poliembriónicas de comercio interno en nuestro país<sup>1,2</sup>. En el 2013 la producción nacional de mango alcanzó un incremento de 196,5 por ciento en comparación con el mismo mes del año pasado, con un superávit en Ica de 29,2 por ciento<sup>1-3</sup>.

El consumo fresco del mango puede ser aprovechado de diversas formas, su disponibilidad se concentra en determinadas épocas durante el año por ello es considerado un fruto estacional y perecedero; este hecho debe constituir un incentivo para su conservación, allí la importancia de generar alternativas que prolonguen su vida útil.

El proceso de liofilización es el procedimiento de deshidratación más confiable en la conservación de las características sensoriales y nutricionales de un producto alimenticio, gracias al uso de bajas temperaturas y condiciones especiales de vacío, de ahí el objetivo del presente estudio de comprobar que el proceso de liofilización de la pulpa de mango no afectase su composición química y la actividad antioxidante de esta fruta<sup>3-5</sup>.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material botánico

Muestra de mango (*Mangifera indica* L.) de las diferentes variedades: Chato, Rosado, de Carne y de Chupar. Las cuales fueron adquiridas en los mercados de la ciudad de Ica entre los meses de febrero y marzo del 2014. Los análisis químicos fueron efectuados en los laboratorios de análisis instrumental y control de calidad, el proceso de liofilización en el laboratorio de tecnología farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.

### Determinaciones analíticas

Se realizó los análisis bromatológicos ante y post tratamiento de liofilización a la pulpa de las cuatro variedades de mango según la metodología de la AOAC<sup>6</sup> y FAO<sup>7</sup>, los carbohidratos se determinó por diferencia. Para la determinación de carotenoides totales se realizó una extracción con alcohol isopropílico y lectura al espectrofotómetro a 460 nm<sup>8</sup> y los resultados se expresan como  $\beta$ -carotenos, la actividad antioxidante se realizó por reducción del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), con una absorbancia a 515nm.

El proceso de liofilización se llevó a cabo en un liofilizador marca Shuin, congelando la muestra a -60 °C por 24 horas y un proceso de deshidratación a una presión de 900 mmHg por 72 horas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 1.** Características de variedades de mango estudiadas

<b>Variedades no injertadas o poliembriónicas</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Forma</b>	<b>Color</b>	<b>Sabor</b>	<b>Cosecha</b>
<b>Chato</b>	Grande	Notablemente aplanada en un extremo	Amarillo anaranjado con chapa rojiza	Agradable	Dic-Febr.
<b>Carne</b>	Mediano	Oval redondo con una abertura al medio	Amarillo	Agradable	Febr-Mar.
<b>Rosado</b>	Grande	Oval redondo con una abertura al medio	Amarillo	Agradable	Febr-Mar.
<b>Chupar</b>	Pequeño	Oval	Amarillo	Agradable	Mar-Abr.

La producción se centra en los meses de verano, principalmente febrero-marzo, estas variedades son más pequeñas que las cultivadas en la costa norte de país, que presenta un color rojo-amarillo y cuya producción es entre los meses noviembre a diciembre, principalmente (AGROBANCO – INIA)<sup>3,5</sup>.

**Tabla 2.** Rendimiento porcentual de pulpa según variedades

<b>Porción</b>	<b>Variedad de mango</b>			
	<b>Chato</b>	<b>Carne</b>	<b>Rosado</b>	<b>Chupar</b>
<b>Peso fruta</b>	246,84±19,2	167,44±37,9	224,96±45,8	127,92±26,0
<b>Peso de cáscara</b>	28,19± 3,22	21,95±3,70	28,71±4,82	17,51±3,16
<b>Peso de pepa</b>	51,34±8,25	30,35±5,46	42,93±11,2	33,60±5,84
<b>Peso de pulpa</b>	162,55±15,6	112,32±32,2	149,99±31,4	73,85±18,03
<b>Rendimiento promedio %</b>	65,32± 3,92 <sup>a</sup>	66,19± 5,42 <sup>a</sup>	67,73 ± 2,73 <sup>a</sup>	57,47± 4,59 <sup>b</sup>

Letras superíndices iguales significa que no hay diferencia estadística significativa

Se representa el peso promedio de 10 unidades, resultando el más pequeño la variedad de chupar; sin embargo, todas estas variedades serían pequeñas comparadas con las variedad injertadas (peso oscila entre 600 a 800 g). Las variedades chato, carne y rosado no presentaron diferencia significativa en su rendimiento de pulpa, estando muy cerca al rendimiento de variedades injertadas (70 a 75 %)<sup>9</sup>. El chato y rosado se utilizan para elaboración de pulpa y jugos concentrados<sup>5</sup>.

**Tabla 3.** Rendimiento de la liofilización de pulpa de mango

Porción	Variedad de mango			
	Chato	Carne	Rosado	Chupar
<b>Peso promedio de fruta fresca (g)</b>	19,11±2,41	21,90±2,96	20,09±0,62	24,11±1,92
<b>Peso promedio de fruta liofilizada (g)</b>	6,16±0,26	7,46±0,64	8,01±0,11	7,48±0,82
<b>Rendimiento promedio %</b>	32,59±3,47 <sup>a</sup>	34,17±1,68 <sup>a</sup>	33,24±0,40 <sup>a</sup>	31,05±2,65 <sup>a</sup>

Valor promedio de tres repeticiones. Letras superíndices iguales significa que no hay diferencia estadística significativa

Como se puede apreciar el rendimiento del proceso de liofilización no presentó diferencias con respecto a la variedad de mango, siendo la variedad de chupar ligeramente menor en su rendimiento. El rendimiento depende del tipo de fruta y el proceso aplicado<sup>10-12</sup>.

**Tabla 4.** Análisis químico proximal de pulpa fresca, según variedades de mango

Análisis proximal	Variedades de mango			
	Chato	Carne	Rosado	Chupar
<b>Humedad g/100 g</b>	78,90	76,58	74,26	78,71
<b>Cenizas g/100 g</b>	0,77	0,69	0,72	0,58
<b>Grasa g/100 g</b>	0,11	0,09	0,1	0,09
<b>Proteína g/100 g</b>	1,53 <sup>a</sup>	1,06	1,04	1,55 <sup>a</sup>
<b>pH</b>	4,00	4,04	4,29	4,77
<b>Acidez g/100 g</b>	0,5	0,4	0,35	0,2
<b>Sólidos solubles g/100 g</b>	17,4	19,8	22,2	18,7
<b>Carbohidratos g/100 g</b>	18,69	21,58	23,88	19,07

Letras superíndices iguales significa que no hay diferencia estadística significativa

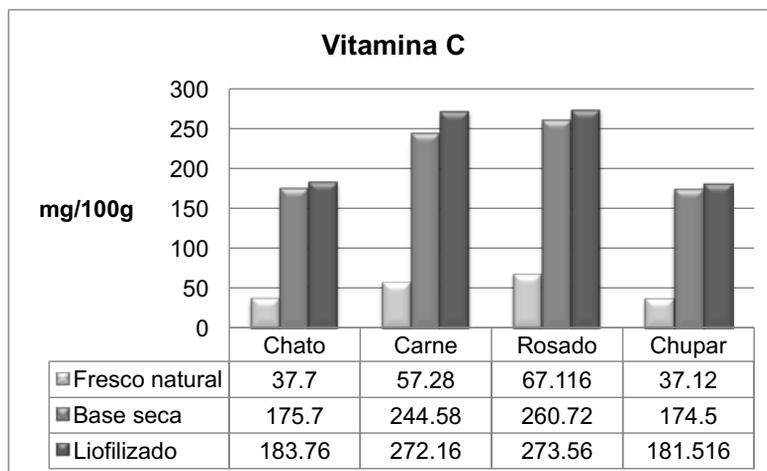
En el análisis químico proximal de la pulpa de las cuatro variedades no se aprecia diferencia significativa más que en solo en dos parámetros: proteína que en las variedades chato y de chupar supera en promedio 50 % a las otras dos y la acidez presentó diferencias en las cuatro variedades, las cuales estuvieron entre 0,2 – 0,5; sin embargo, todos estos valores se encuentra dentro del rango de variación que reporta Ramírez *et al.*, 2010<sup>13</sup> para trece cultivares de mango en Venezuela. Se puede observar que existe una correlación entre menor acidez y mayor valor de pH en los cuatro tipos de mangos. Asimismo, se debe tener en cuenta que la variedad rosado presentó un mayor contenido de sólidos solubles (Brix 22.2) que lo reportado en otros estudios<sup>9</sup>, que implicaría un mayor grado de madurez; los valores de carbohidratos se han obtenido por cálculos, por lo que pequeñas diferencias en los otros parámetros determinados (humedad, proteína, cenizas y grasas) se expresen en éste como una diferencia significativa.

**Tabla 5.** Análisis químico proximal de pulpa liofilizada según variedades de mango

Análisis proximal	Variedades de mango			
	Chato	Carne	Rosado	Chupar
Humedad g/100 g	2,32	3,34	2,81	2,72
Cenizas g/100 g	3,41	2,54	2,35	2,32
Grasa g/100 g	0,75 <sup>b</sup>	0,46 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	0,4 <sup>a</sup>
Proteína g/100 g	7,62	6,27	4,93	6,87
pH	3,58	3,52	3,74	3,89
Acidez g/100 g	2,5 <sup>a</sup>	2,4 <sup>a</sup>	2,16 <sup>b</sup>	1,69 <sup>c</sup>
Carbohidratos g/100 g	85,90	87,39	89,44	87,69

Letras superíndices iguales significa que no hay diferencia estadística significativa.

La muestra de pulpas liofilizadas al análisis químico bromatológico no presentaron diferencias significativas entre ellas salvo en la determinación de grasa, la cual se puede atribuir a un error analítico. Al convertir los datos de muestra fresca en base seca y comparar con las liofilizadas, únicamente se puede apreciar diferencia significativa en la determinación de acidez. Se debe tener en cuenta que las frutas contienen ácidos orgánicos de forma libre o combinada<sup>11,14</sup> que están disueltos en las vacuolas de las células que al eliminar el agua se concentrarían.



**Figura 1.** Contenido de vitamina C en pulpa de mango según variedad

La variedad carne y rosado muestran un mayor contenido de vitamina C al estado fresco, con valores superiores a lo declarado en la tabla peruana de composición de alimentos para el mango, pudiéndose clasificar a esta fruta como una excelente fuente de vitamina C. El proceso de liofilización no afecta significativamente el contenido de vitamina C, estos datos son concordantes con los de otros autores a otras variedades de frutas (Huaraca *et al.* 2010<sup>11</sup> y Amores *et al.* 2011<sup>12</sup>) los cuales manifiestan que el proceso de liofilización permite preservar este componente.

**Tabla 6.** Relación del contenido de carotenoides totales (mg  $\beta$ -caroteno/100 g)

Variedad	Pulpa fresca (b.s)	Pulpa liofilizada	% pérdida
<b>Chato</b>	238,30	140,9	40,9
<b>Carne</b>	169,32	122,78	27,5
<b>Rosado</b>	1010,20	645,42	36,1
<b>Chupar</b>	269,05	172,64	35,8

b.s. = base seca.

El contenido de carotenoides totales se vio afectado considerablemente con el proceso de liofilización (congelación a  $-60$  °C y deshidratado por 72 horas) en todas variedades de mango, siendo la más afectada la variedad carne con una pérdida de 40,9 %. Esto se vio reflejado en la pérdida de color del liofilizado<sup>16</sup>.

**Tabla 7.** Determinación de la capacidad de inhibición del radical DPPH

Variedades de mango	Pulpa fresca (b.s.)		Pulpa liofilizada	
	Concentración mg/ ml	% Inhibición DPPH	Concentración mg/ml	% Inhibición DPPH
<b>Chato</b>	12,39	32,26	12,05	16,12
<b>Carne</b>	10,73	61,69	10,7	30,55
<b>Rosado</b>	13,42	32,05	12,2	28,7
<b>Chupar</b>	10,44	40,08	10,2	14,94

La pérdida de la actividad antioxidante en las distintas variedades de pulpa de mango, podemos atribuirla principalmente a la pérdida de carotenoides totales que son sustancias con reconocida actividad antioxidante<sup>14,15</sup>.

### CONCLUSIONES

- La composición química proximal de la pulpa fresca de las cuatro variedades de mango no presenta diferencias significativas; sin embargo, en cuanto a los compuestos bioactivos, la variedad rosado presenta mayor contenido de vitamina C y carotenoides.
- En el análisis químico proximal de la pulpa liofilizada se puede ver diferencia significativa en el mayor contenido de grasa en la variedad chato y un menor contenido de proteína en la variedad rosado, con respecto a sus compuestos bioactivos, menor contenido de vitamina C y carotenoides en la variedad chato, pero mayor actividad antioxidante en la variedad carne y rosado.
- Con respecto al efecto del proceso de liofilización afectó significativamente parámetros como: el contenido de acidez que se incrementó y una reducción apreciable en el contenido de carotenoides y actividad antioxidantes en todas las variedades de mango.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Ica, Tierra de Paracas, Pallares Pisco y Pecanas [Internet]; 2009. [Acceso 12 Ene 2014]. Disponible en: [http://www.senoriodesulco.com/docs/articulos/art\\_9\\_ica\\_tierra\\_de\\_paracas\\_pallares\\_piscos\\_y\\_pecanas.pdf](http://www.senoriodesulco.com/docs/articulos/art_9_ica_tierra_de_paracas_pallares_piscos_y_pecanas.pdf)
2. Ministerio de Salud-Instituto Nacional de Salud. Tabla Peruana de Composición de los Alimentos. Lima-Perú: INS; 2009.
3. Ministerio de Agricultura. Oficina General de Planificación Agraria. Perfil de Mercado del Mango. Unidad de Comercio internacional. 2006. [Acceso 15 de junio

- 2014]. Disponible en: <http://www.prompex.gob.pe/Miercoles/Portal/MME/descargar.aspx?archivo=CCF5075F-376A-4070-ACA1-FF27BB9171A4.PDF>
4. Instituto Nacional de Investigación Agraria. Variedades de Mango. [Tríptico]. Lima: INIA; 2008.
  5. MINCETUR. Perfil del Mercado y Competitividad Exportadora de Mango [Internet]. [Acceso 24 de noviembre 2013]. Disponible en: <http://bibliotecavirtual.corpmontana.com/handle/123456789/168?show=full>
  6. AOAC. Official Methods of Analysis. 18th ed. Gaithersburg: Association the Official Agricultural Chemists; 2007.
  7. FAO. Manuals of food quality control. Food and nutrition paper 14/7. Rome: FAO; 1986.
  8. Britton, G. Carotenoids and Colors in Fruits and vegetables. Phytochemistry of fruit and vegetables, eds. Clarendon Press, Oxford, pp.11 -27 (1997).
  9. Marulanda J. Determinación del perfil de calentamiento y evaluación sensorial en la elaboración de pulpa liofilizada de mango variedad *Tommy Atkins*. [Tesis]. Manizales-Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencia y Tecnología de los Alimentos; 2002. [Acceso 24 de noviembre 2013]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/1009/1/jorgemariomarulandaloaiza.2002.pdf>
  10. Natividad L, Cáceres J. Algunos aspectos técnicos sobre la liofilización de pulpa de cocona (*Solanum sessiliflorum Dunal*). RVCTA. 2013; 4 (2): 207-218.
  11. Huaraca A. Evaluación nutritiva y nutracéutica de la frutilla (*Fragaria vesca*) deshidratada por el método de liofilización y comparación con la obtenida por deshidratación en microondas. Riobamba – Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias - Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2011.
  12. Amores D. Evaluación Nutritiva y Nutraceútica de la Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) Deshidratada por el Método de Liofilización y Comparación con la obtenida por Deshidratación en Microondas y Secador en bandejas. [Tesis]. Riobamba – Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias - Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2011. [Acceso 20 de mayo 2014]. Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/1989/1/56T00297.pdf>
  13. Ramírez R, Quijada O, Castellano G, Burgos M, Camacho R, Marin C. Características Físicas y Químicas de Frutos de Trece Cultivares de Mango (*Mangifera indica* L) en el Municipio Mara en la Planicie de Maracaibo. Rev Iber Tecnología Postcosecha. 2010; 10(2): 65-72.
  14. Perkins P, Manthey J. Explorando Los Fitoquímicos del Mango Importado. [Internet]. Servicio de Investigación Agrícola de la USDA; 2007. [Acceso 20 de Junio 2014]. Disponible en: <http://www.mango.org/Mangos/media/Media/Documents/Research%20And%20Resources/Research/Industry/Nutrition/Fitoquimicos-del-mango-importado-Reporte-1.pdf>
  15. Salamanca G, Forero F, García J, Díaz C. Avances en la Caracterización, Conservación y Procesamiento del Mango (*Mangifera indica* L.). Revista Tumbaga. 2007; 2: 57-64.
  16. Ingeniería en Industrias Alimentarias / Instituto Tecnológico Superior de Calkiní. Deshidratación: secado y liofilización. [Artículo virtual]; 2011 [Acceso 15 de febrero 2014]. Disponible en: <https://www.revistavirtualpro.com/biblioteca/deshidratacion-secado-y-liofilizacion>.

## SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE $(\text{WO}_3)_n$ VÍA SOL-GEL MEDIANTE TÉCNICA DE RECUBRIMIENTO POR INMERSIÓN

Juan C. Morales Gomero<sup>a</sup>, Alberto Corzo Lucioni<sup>b</sup>, Hugo Alarcón Cavero<sup>c</sup>,  
Darío Lazo Hoyos

### RESUMEN

En la presente investigación se sintetizaron películas de  $(\text{WO}_3)_n$  mediante la metodología Sol-Gel por técnicas de recubrimiento por inmersión (“dip coating”) utilizando  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  como sal precursora para formar el ácido politúngstico  $((\text{WO}_3)_n \cdot n\text{H}_2\text{O})$ , el cual por deshidratación formó el óxido  $((\text{WO}_3)_n)$  que se depositó en dos sustratos diferentes: acero inoxidable 316L y vidrio conductor FTO (Fluorine doped Tin Oxide), los cuales fueron depositados bajo las mismas condiciones experimentales y posteriormente sometidos a sinterización a 400 °C por lapso de 30 minutos para ambos casos.

Se observó que la película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositada sobre acero presentó mayor fotocorriente generada de 133  $\mu\text{Acm}^{-2}$ , frente a 29  $\mu\text{Acm}^{-2}$  para la película de  $(\text{WO}_3)_n$  medida por voltametría cíclica en un potenciostato (AUTOLAB PGSTAT302N) frente a la película soportada en FTO. Las películas fueron caracterizadas mediante técnicas de Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), utilizando el espectrofotómetro FTIR SHIMADZU IR PRESTIGE 21 para reconocer los enlaces W-O-W (826  $\text{cm}^{-1}$ ), existentes sobre la superficie del FTO y enlaces W-O-W (652  $\text{cm}^{-1}$ ), W=O (953  $\text{cm}^{-1}$ ), W-O (1414  $\text{cm}^{-1}$ ) y la vibración O-H (2338  $\text{cm}^{-1}$ ) existentes sobre la superficie del acero; Espectroscopía Raman a 532 nm para confirmar estiramientos simétricos de los enlaces W-O que no pudieron ser identificados claramente por FTIR; Difracción de Rayos X (DRX) para confirmar la estructura cristalina de las películas, encontrando una estructura predominantemente monoclinica cuya estructura base corresponde a  $\text{WO}_3$ , y un estimado aproximado de tamaño de cristalito de 27,4 nm determinado mediante la ecuación de Debye Scherrer y Energía Dispersiva de Rayos X (EDX) para el análisis elemental, arrojando una composición centesimal de 77,7 % en masa de W correspondiente a la fórmula empírica de  $\text{WO}_3$  y finalmente un análisis morfológico por Microscopía de Barrido Electrónico (SEM) que mostró la formación de capas (películas) con nanoestructuras cuyo tamaño de partícula no uniforme oscilan entre 50 y 100 nm las mismas que quedaron fuertemente adheridas a la superficie del sustrato.

**Palabras clave:** Ácido politúngstico,  $(\text{WO}_3)_n$ , FTO, sol – gel, voltametría cíclica.

---

<sup>a,b,c</sup> Laboratorio de Docimasia, Universidad de Lima, Av. Javier Prado Este, cuadra 46 s/n, Santiago de Surco, Lima 33. Correspondencia a: albertocorzolucioni@hotmail.com

## **SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF $(\text{WO}_3)_n$ VIA SOL-GEL FILMS USING DIP COATING TECHNIQUE**

### **ABSTRACT**

In the present investigation  $(\text{WO}_3)_n$  films were synthesized by Sol-Gel methodology by dip coating techniques using  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  as precursor salt to form polytungstic acid  $((\text{WO}_3)_n \cdot n\text{H}_2\text{O})$ , which by dehydration formed the oxide  $(\text{WO}_3)_n$  that was deposited in two different substrates: 316L stainless steel and FTO (Fluorine doped Tin Oxide), which were deposited under the same experimental conditions and subsequently sintered at  $400^\circ\text{C}$  for a lapse of 30 minutes in both cases.

It was observed that the film of  $(\text{WO}_3)_n$  deposited on steel presented a greater photocurrent generated of  $133 \mu\text{Acm}^{-2}$ , compared to  $29 \mu\text{Acm}^{-2}$  for  $(\text{WO}_3)_n$  film measured by cyclic voltammetry in a potentiostat (AUTOLAB PGSTAT302N) against the FTO-supported film. The films were characterized using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) techniques, using the SHIMADZU IR PRESTIGE 21 FTIR spectrophotometer to recognize W-O-W ( $826 \text{ cm}^{-1}$ ) links on the surface of the FTO and W-O-W links ( $652 \text{ cm}^{-1}$ ), W=O ( $953 \text{ cm}^{-1}$ ), W-O ( $1414 \text{ cm}^{-1}$ ) and O-H vibration ( $2338 \text{ cm}^{-1}$ ) on the steel surface; Raman spectroscopy at  $532 \text{ nm}$  to confirm symmetric stretches of W-O bonds that could not be clearly identified by FTIR; X-ray diffraction (XRD) to confirm the crystalline structure of the films, finding a predominantly monoclinic structure whose base structure corresponds to  $\text{WO}_3$ , and an approximate estimate of crystallite size of  $27,4 \text{ nm}$  determined by the equation of Debye Scherrer and X-ray Dispersive Energy (EDX) for elemental analysis, yielding a centesimal composition of  $77,7 \%$  by mass of W corresponding to the empirical formula of  $\text{WO}_3$ , and finally a morphological analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM) that showed which showed the formation of layers (films) with nanostructures with non-uniform particle size ranging between  $50$  and  $100 \text{ nm}$

**Key words:** Politungstic acid,  $(\text{WO}_3)_n$ , FTO, sol - gel, cyclic voltammetry.

### **INTRODUCCIÓN**

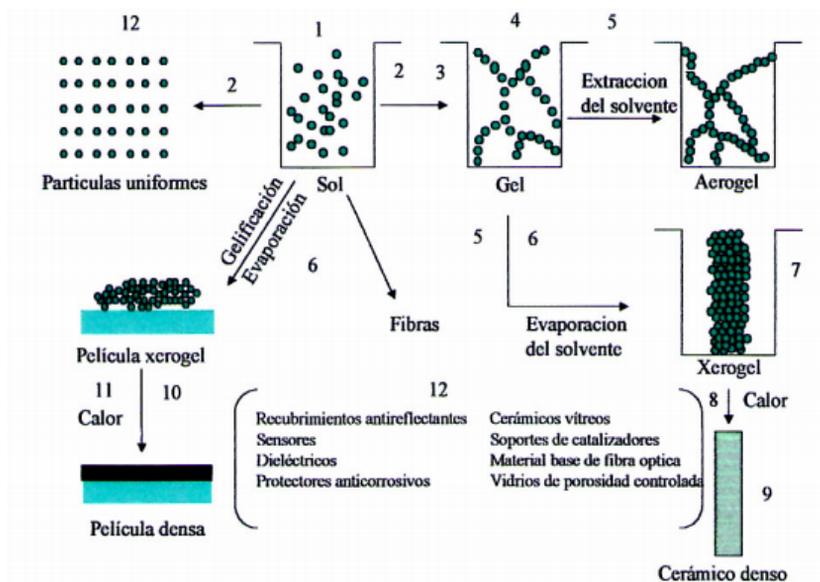
La síntesis de películas delgadas viene desarrollándose hace algunos años con múltiples aplicaciones en fotocátalisis, fotoelectrocátalisis, productos y dispositivos que se utilizan en la industria óptica y electrónica. Este avance ha sido posible gracias a las técnicas de deposición, (como dip coating) de películas en distintos sustratos; técnicas que permiten la obtención de láminas de elevada calidad y excelentes características<sup>1</sup>.

El objetivo primordial de las capas delgadas es la modificación de las propiedades de la superficie de un material, con la finalidad de obtener una mejora en las propiedades del conjunto capa – sustrato, o para que cumpla alguna función específica como recubrimientos funcionales<sup>2</sup>. Este proceso también está siendo ampliamente utilizado para la preparación

de cerámicos y vidrios. En este caso, se parte de un precursor molecular que es obtenido vía reacción de polimerización inorgánica. El proceso sol-gel tiene ventajas respecto a otras técnicas de preparación de los óxidos, como por ejemplo buena homogeneidad de los materiales obtenidos, baja temperatura de preparación, obtención de nuevas fases cristalinas de sólidos cristalinos, fabricación de productos de vidrio con propiedades especiales, estructuras especiales como películas delgadas y desventajas como control de la contracción del material durante el proceso, control de los poros finos residuales, control de los residuos de hidroxilo, riesgo de contaminación de componentes orgánicos, tiempo largo de proceso<sup>3</sup>.

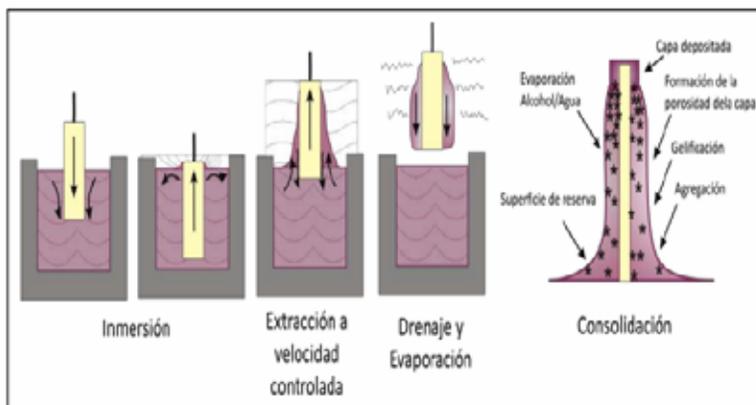
Dentro de los tipos de sistemas coloidales destacan los soles, formados por una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido, donde el término partícula describe aquellos soles formados en medio acuoso. En soluciones no acuosas se define al término de sol como aquellos sistemas donde la fase sólida no contiene partículas mayores a 1 nm; y los geles, que se definen como un sistema conformado por dos fases que contiene un sólido continuo y una fase líquida. Si una molécula alcanza dimensiones macroscópicas de modo que se extiende a través de la solución, la sustancia se denomina gel<sup>4</sup>. El proceso sol-gel reemplaza las técnicas clásicas de fabricación de materiales a altas temperaturas por un proceso que se realiza a temperaturas menores y en el cual es posible formar redes mediante polimerización de monómeros a temperatura ambiente. La química del proceso sol-gel se basa en la hidrólisis y condensación de precursores moleculares<sup>5</sup>. En la figura 1 se presenta el esquema de las rutas de fabricación que se podrían seguir en el proceso sol-gel<sup>3,7</sup>.

En los recubrimientos producidos por sol-gel, las técnicas de deposición más utilizadas son el centrifugado, la pulverización, la deposición electroforética y la inmersión (dip coating), siendo esta última la más estudiada. Comparadas con otros métodos de deposición convencionales como deposición química en fase vapor (CVD), pulverización asistida por plasma, evaporación/condensación, etc., las técnicas de deposición de soles se caracterizan por ser procesos esencialmente mecánicos que no necesitan un gran equipamiento, que se pueden aplicar a sustratos con formas complejas y de gran tamaño, y sobre sustratos que no admiten tratamientos a alta temperatura, como es el caso de la mayoría de los metales o polímeros<sup>6</sup>.



**Figura 1.** Esquema de las etapas del proceso Sol-Gel. 1. Hidrólisis del precursor inorgánico; 2. Proceso de condensación, formación y estabilización del sol; 3. Crecimiento del cluster que al unirse a otros forman el Gel; 4. Reacciones químicas que endurecen y contraen la estructura polimérica; 5-6. Secado y Evaporación del gel, evaporación del líquido en el interior del gel y difusión del vapor hacia el exterior; 7. Obtención de geles secos llamados xerogeles o xerogels; 8. Sinterizado viscoso; 9. Formación de un material cerámico; 10. Formación de una película densa; 11. Obtención de diversos materiales mediante el control en su composición y estructura<sup>7</sup>.

El proceso de dip coating es el más utilizado para la producción de recubrimientos sol-gel y transcurre en cuatro etapas<sup>6</sup>: (1) inmersión del sustrato, (2) extracción a velocidad constante y controlada, (3) drenaje con evaporación de disolventes y (4) consolidación de la capa. El sustrato a recubrir se introduce en la solución hasta que esta lo recubre perfectamente y se extrae a velocidad constante estableciéndose un régimen estacionario donde intervienen el sol, el sustrato y la atmósfera. De esta forma, una parte de la solución queda adherida al sustrato en forma de película y otra pasa de nuevo a la solución. Una vez obtenido el recubrimiento se procede a su secado y posterior tratamiento térmico<sup>8,9</sup>. En la figura 2 se muestra un esquema de las etapas del proceso de inmersión antes de la etapa de consolidación térmica.



**Figura 2.** Etapas del proceso de inmersión-extracción: Las condiciones principales del sol para preparar recubrimientos por inmersión son principalmente baja concentración y baja viscosidad. Esto permite usar velocidades de extracción altas al reducirse los efectos de borde o imperfecciones superficiales. La etapa de extracción es la más importante y sus fundamentos teóricos han sido ampliamente estudiados<sup>6,8,9</sup>.

## PARTE EXPERIMENTAL

En la presente investigación se aplicó la metodología sol-gel para la síntesis de películas de  $(\text{WO}_3)_n$  soportadas en dos tipos de sustratos: acero y vidrio conductor FTO, a partir de la obtención de soles de  $\text{H}_2\text{WO}_4$  por medio de reacciones de hidrólisis (usando  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  como sal precursora) con una resina de intercambio iónico fuertemente ácida (Resina Dowex 50W-X8 y tamaño de partícula 0,09-0,25mm) y posterior tratamiento térmico para la deshidratación del gel de ácido politungstico  $(\text{WO}_3)_n \cdot n\text{H}_2\text{O}$  en  $(\text{WO}_3)_n$  adherida a la superficie de los sustratos.

### 1.- Limpieza de los sustratos de soporte

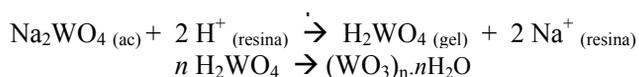
Los sustratos de FTO y acero inoxidable 316L fueron limpiados previamente antes de ser utilizados. El sustrato de FTO fue limpiado con una solución de  $\text{HNO}_3$  al 5 % y  $\text{NaClO}$  al 5 % en partes iguales, frotando la superficie conductora hasta obtener una superficie limpia y brillante. Los sustratos de acero fueron sometidos primeramente a un pulido mecánico usando una lija de grano N° 200 frotándolo unidireccionalmente hasta conseguir una superficie uniforme y brillante, posteriormente se sometió a una limpieza profunda por medio de pulido electroquímico introduciendo un ánodo del sustrato de acero en una mezcla homogénea de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 50 % cada uno y aplicando una diferencia de potencial constante a 15 V y una densidad de corriente de 0,5 A/cm<sup>2</sup> por un lapso de 2 minutos manteniendo una temperatura constante de 40 °C, finalmente ambos sustratos (acero y FTO) fueron colocados en una tina ultrasónica con metanol, propanona y agua ultrapura durante 10 minutos para luego terminar siendo secados con nitrógeno comprimido.

## 2.- Formación de los soles de $(\text{WO}_3)_n \cdot n\text{H}_2\text{O}$

Se preparó una solución 0,1 M de  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  que fue la sal precursora y se hizo pasar 10 alícuotas de 10 mL cada una a través de una columna de intercambio iónico que contenía la resina fuertemente ácida (Dowex) (la cual fue previamente sumergida en solución de HCl 2N) con la finalidad de intercambiar el catión  $\text{Na}^+$  por el  $\text{H}^+$  y además retener los iones  $\text{Na}^+$  en el interior de la resina evitando futuras interferencias posibles.

La recolección del ácido polítungstico se realizó cuando las pociones eluidas a través de la columna presentaban un pH aproximado de 2; en estas condiciones la dispersión coloidal recolectada adquirió un color amarillo claro. Finalmente se adicionó una alícuota de solución acuosa de propanona (10 % en volumen) para mantener estable la dispersión coloidal por mayor tiempo y así poder formar apropiadamente las películas. Transcurridos 40 minutos de iniciada la elución, se observó que esta dispersión recolectada se enturbió y empezó a coagularse, debido a la aglomeración de los soles que terminaron formando el xerogel, por lo que el tiempo óptimo escogido para formar las películas fue de 20 minutos después de iniciada la elución. Finalmente, para la limpieza de la resina en el interior de la columna de intercambio iónico y evitar la acumulación de gel de ácido polítungstico se hizo pasar una solución de NaOH 2N que remueve trazas de sal precursora y residuos gelosos de  $\text{H}_2\text{WO}_4$ , acto seguido se neutralizó una solución de HCl 2N hasta que el pH de la solución eluida de la columna intercambiadora sea neutro. Inmediatamente después se hizo pasar agua ultrapura para eliminar iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  que pudieran quedar retenidos superficialmente en la resina y que pudieran codepositarse en las posteriores películas de  $(\text{WO}_3)_n$  a formarse.

Este control se hizo mediante medidas de conductividad eléctrica. Las reacciones químicas demuestran lo mencionado en el párrafo anterior:



**Figura 3.** Formación de soles de ácido polítungstico  $(\text{WO}_3)_n \cdot n\text{H}_2\text{O}$  usando una columna intercambiadora iónica que contiene una resina fuertemente ácida.

### 3.- Formación de las películas delgadas de $(\text{WO}_3)_n$ <sup>3</sup>

Transcurridos los primeros de 20 minutos desde que comenzó a eluir la fase móvil de la columna intercambiadora (que contiene los soles de  $(\text{WO}_3)_n \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) se procedió a realizar el recubrimiento sobre los sustratos de acero y FTO por medio de la técnica dip coating. Los sustratos fueron precalentados hasta una temperatura aproximada de 50 °C por medio de una pistola que expulsa aire caliente. Luego se introdujeron en la dispersión coloidal recolectada que contiene los soles de  $(\text{WO}_3)_n \cdot n\text{H}_2\text{O}$  a una velocidad controlada de 2,5 cm/s y se los dejó sumergidos por 30 segundos. Transcurrido este lapso los sustratos fueron retirados de la dispersión coloidal controlando estrictamente la velocidad de expulsión por medio del controlador electrónico programable Arduino (Fig. 4). Durante el ascenso de los sustratos se realizó la etapa de drenaje mediante evaporación del solvente (agua), para lo cual se utilizó nuevamente la pistola de aire caliente para calentar los sustratos a 50 °C durante 15 segundos, con lo cual se logró, a simple vista, una adherencia uniforme de las películas sobre cada sustrato de color ligeramente amarillo, correspondientes al gel de ácido politúngstico  $(\text{WO}_3)_n \cdot n\text{H}_2\text{O}$  (ello constituye la última etapa denominada "consolidación de la capa"). Finalmente, los sustratos con las películas depositadas y uniformemente adheridas se dejaron enfriar a temperatura ambiente por un lapso de 15 segundos. Todo este procedimiento se repitió 20 veces. Por último, los sustratos con las películas depositadas fueron secados con N2 comprimido para luego ser sinterizados en una mufla a 450 °C durante 30 minutos.

La ecuación química que representa lo indicado es:



**Figura 4.** Inmersión y expulsión de sustratos en la dispersión coloidal y posterior secado de las primeras películas hidratadas de  $(\text{WO}_3)_n \cdot n\text{H}_2\text{O}$  usando una pistola que expulsa aire caliente a 50 °C

## **4. Caracterizaciones de las películas delgadas formadas**

### **4.1 Espectroscopía FTIR**

La caracterización del tipo de enlace formado en la superficie, tanto como para la película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositado sobre FTO y en acero fueron realizados por el equipo SHIMADZU IR PRESTIGE 21 (FTIR), realizando un barrido desde  $400\text{ cm}^{-1}$  hasta  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

### **4.2 Espectroscopía RAMAN**

La caracterización del tipo de enlace en las películas de  $(\text{WO}_3)_n$  presente sobre las superficie de FTO y acero fue llevada a cabo en el equipo XPLORA ONE RAMAN MICROSCOPE, utilizando el laser verde cuya longitud de onda es  $532\text{ nm}$ , realizando un barrido de  $500\text{ cm}^{-1}$  hasta  $1200\text{ cm}^{-1}$ .

### **4.3 Difracción de Rayos X**

Para determinar la estructura cristalográfica de la superficie de la película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositada en la superficie de FTO se realizó con el Difractómetro BRUKER D8 ADVANCE utilizándose radiación  $\text{CuK}\alpha$  a una longitud de onda de  $1,54178\text{ \AA}$  operando a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , realizando un barrido de  $2\theta^\circ$  hasta  $55^\circ$ , y utilizando como sustancia pura patrón cristal de calcita. Además se pudo obtener por cálculo en base a la ecuación de Debye Scherrer un estimado del tamaño de cristalito promedio en las películas depositadas sobre los sustratos.

### **4.4 Energía Dispersiva de Rayos X**

Para una caracterización elemental de las películas de  $(\text{WO}_3)_n$  soportada sobre el sustrato de acero y FTO se utilizó el equipo Oxford Instruments X-Max EDS, obteniendo distintos porcentajes de los elementos propios de los sustratos y las películas.

### **4.5 Microscopía Electrónica de Barrido**

El tamaño de partícula promedio así como la morfología de las estructuras de  $(\text{WO}_3)_n$  depositadas sobre sustrato de FTO fueron determinadas por microscopía de barrido electrónico, usando el microscopio de barrido electrónico Carl Zeiss, EVO 10 MA, con un voltaje de aceleración en el rango de  $1$  a  $20\text{ kV}$  y una corriente de haz de  $1$  hasta  $500\text{ pA}$  y un detector de electrones secundarios.

### **4.6 Voltametría Cíclica de Barrido**

Las propiedades fotoelectroquímicas de las películas de  $(\text{WO}_3)_n$  depositadas en la superficie de FTO y acero se estudiaron por voltametría cíclica de barrido utilizando como electrolito una solución  $0,5\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; como contra electrodo una placa de carbón y como electrodo de referencia  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ . La velocidad de barrido fue de  $50\text{ mV/s}$  durante  $5$  ciclos. Estos barridos comenzaron desde  $0\text{V}$  hasta  $1\text{V}$ , tomando como perfil corriente voltaje el último ciclo, obteniendo como resultado la fotocorriente generada al irradiar estas películas con luz UV de  $365\text{ nm}$  a una intensidad de radiación de  $1,81\text{ mW/cm}^2$ . Para determinar la fotocorriente generada en la superficie de las películas de  $\text{WO}_3$  soportadas sobre sustratos de FTO y acero, se utilizó el potencióstato/galvanostato de Metrohm Autolab PGSTAT 302N obteniendo un registro de fotocorriente generada.

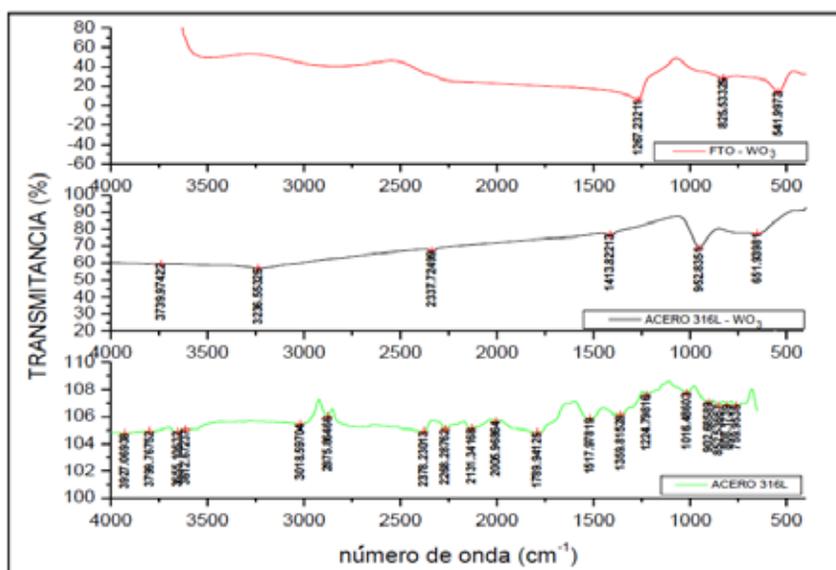
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante las diversas técnicas de caracterización antes mencionadas se obtuvieron los siguientes resultados:

### 1. Espectroscopía FT-IR

La espectroscopía FTIR confirmó la presencia de enlaces químicos en la estructura de  $(\text{WO}_3)_n$  depositado sobre las superficie de FTO y acero. En la figura 5 se muestran los espectros IR (graficados en porcentaje de transmitancia vs. número de onda en  $\text{cm}^{-1}$ ) que presentan una serie de bandas de vibraciones de estiramiento, flexión en el plano y flexión fuera del plano.

En la tabla 1 se muestran los picos de transmitancia a distintas frecuencias (expresadas en número de onda) para las película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositada en la superficie de FTO y acero. Así, por ejemplo, para la película de  $(\text{WO}_3)_n$  soportada en FTO se observan dos tipos de enlaces, O-red cristalina ( $542 \text{ cm}^{-1}$ ) y W-O-W ( $\nu 826 \text{ cm}^{-1}$ ); mientras que la película de  $(\text{WO}_3)_n$  soportada en acero se obtuvieron mayor cantidad de picos que indican la presencia de enlaces W-O-W ( $\nu 652 \text{ cm}^{-1}$ ), W=O ( $\nu 953 \text{ cm}^{-1}$ ) y W-O ( $\nu 1414 \text{ cm}^{-1}$ ) y O-H ( $\nu 2338 \text{ cm}^{-1}$ ). Esto nos sugirió realizar un análisis más detallado y específico para la película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositada en FTO, por cuanto es posible suponer que la masa depositada fue muy pequeña, quedando algunos picos característicos para los enlaces en el  $\text{WO}_3$  que no son detectados por FTIR, razón por la que se realizaron caracterizaciones por espectroscopía Raman.



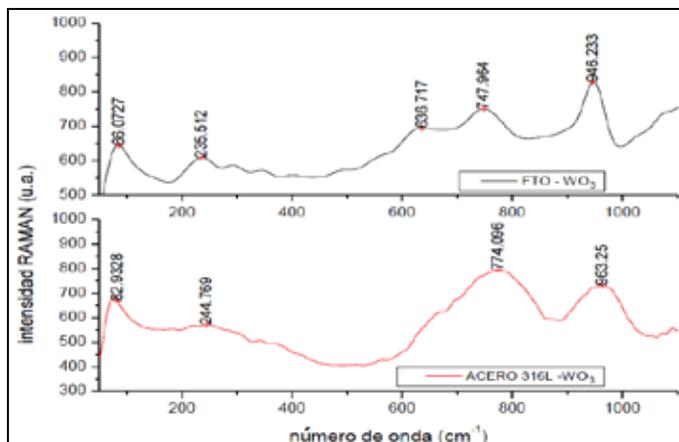
**Figura 5.** Espectros FTIR de una película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositado sobre FTO, película  $(\text{WO}_3)_n$  depositada en una placa de acero 316L y placa de acero 316L.

## 2. Espectroscopía Raman

Los espectros Raman de los óxidos de metales de transición (M) se dan generalmente en el intervalo  $950 - 110 \text{ cm}^{-1}$ , región que se puede asignar a un modo de estiramiento simétrico de terminales cortos  $\text{M}=\text{O}$  correspondiente a la banda de vibración simétrica ( $\nu_s$ ) ( $\text{M}=\text{O}$ ) terminal. Las bandas en el intervalo de  $750 - 950 \text{ cm}^{-1}$  se atribuyen a la extensión antisimétrica de enlaces  $\text{M}-\text{O}-\text{M}$ , es decir, ( $\nu_a \text{M}-\text{O}-\text{M}$ ) o al tramo simétrico de enlaces  $(-\text{O}-\text{M}-\text{O}-)^{10}$ . El pico más intenso está situado en  $946 \text{ cm}^{-1}$  para el sustrato puro de FTO y  $963 \text{ cm}^{-1}$  para el sustrato puro de acero, pertenece a ( $\nu_s \text{W}=\text{O}$  terminal) de los límites del grupo. El estiramiento terminal  $\text{W}=\text{O}$  pertenece a los enlaces  $\text{W}-\text{O}$  en la superficie libre de los granos internos. Esta notable intensidad relativa del doble enlace  $\text{W}=\text{O}$ , típico del oxígeno no puenteante, es causada por las moléculas de agua absorbida y se observa frecuentemente en películas pulverizadas o evaporadas depositadas a temperaturas más bajas<sup>11</sup>. La banda observada a  $774 \text{ cm}^{-1}$ , pertenece al sustrato de acero, siendo muy próxima a  $806 \text{ cm}^{-1}$  la cual se le asigna a los modos de estiramiento asimétrico  $\text{O}-\text{W}-\text{O}$ . La banda  $748 \text{ cm}^{-1}$ , para el sustrato FTO, pertenece al modo de estiramiento  $\text{O}-\text{W}-\text{O}$ . La banda asimétrica a  $637 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente al sustrato FTO, está probablemente asociada a movimientos de estiramiento dentro del plano ecuatorial y está dentro del rango de  $600 - 800 \text{ cm}^{-1}$ . La banda a  $236 \text{ cm}^{-1}$  para el sustrato FTO y  $245 \text{ cm}^{-1}$  para el sustrato de acero, se le asigna a los modos de oscilación del O enlazado a los átomos de W. Todas las discusiones anteriores indican que los cúmulos de la película están conectados entre sí por enlaces  $\text{W}-\text{O}-\text{W}$  o interacciones puente de hidrógeno a través de puentes de agua con enlaces  $\text{W}=\text{O}$  terminales en la superficie de los cúmulos. Dado que el doble enlace  $\text{W}=\text{O}$  es más fuerte que el simple enlace  $\text{W}-\text{O}$ , se espera que su frecuencia de vibración sea mayor que la del enlace  $\text{W}-\text{O}$ .

En conclusión, la única diferencia que existe en los espectros Raman para el sustrato de FTO y sustrato de acero, es la banda a  $637 \text{ cm}^{-1}$ ; debido al apantallamiento de la banda a  $748 \text{ cm}^{-1}$ . Los enlaces característicos en esta banda ( $\nu(\text{O}-\text{W}-\text{O})$ ) están fuertemente unidos al sustrato de acero, lo que requiere de mayor energía para el estiramiento del enlace. En base a la existencia de enlaces  $\text{W}-\text{O}-\text{W}$  podemos suponer que las películas depositadas constituyen una red estructural polimérica de  $(\text{WO}_3)_n$ .

Adicionalmente, se puede deducir que la adhesión de la película de  $(\text{WO}_3)_n$  sobre el sustrato de acero tiene mayor adhesión a comparación de la película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositada sobre el sustrato de FTO.



**Figura 6.** Espectros RAMAN obtenidos de una película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositada sobre FTO y de una película  $(\text{WO}_3)_n$  depositada sobre una placa de acero 316L.

### 3. Difracción de Rayos X

Se obtuvo el espectro de difracción de rayos X (DRX) de la película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositada sobre el sustrato de FTO (figura 8). El análisis DRX indicó que la estructura que mejor se aproxima podría asignarse al patrón monoclinico de  $\text{WO}_3^{12}$ , el cual presenta en la red cristalina vacíos de alto contenido de oxígeno (figura 7). Se observó que el espectro de la película de  $(\text{WO}_3)_n$  formada respecto a un patrón de referencia de  $\text{WO}_3$  puro, existe un ligero corrimiento y la aparición de picos que no se observan en el espectro patrón, esto es posiblemente debido a la interferencia causada por el sustrato de vidrio conductor FTO, toda vez los que la estructura cristalina de la película de  $(\text{WO}_3)_n$  se deposita encima de los planos cristalográficos del FTO modificando sutilmente los planos cristalográficos del  $\text{WO}_3$ . Utilizando la anchura del pico con mayor intensidad del espectro DRX de la película de  $(\text{WO}_3)_n$  se puede determinar el tamaño aproximado del cristalito, para ello se utilizará la ecuación de Debye Scherrer:<sup>13,14,15</sup>

$$D = \frac{k\lambda}{B\cos(2\theta)}$$

Donde: D es el tamaño del cristalito; k es una constante cuyo valor es 0,9;  $\lambda$  corresponde a la longitud de la radiación de la lámpara  $\text{CuK}\alpha$  (1,54178 Å); B el ancho medio del pico de mayor intensidad del espectro DRX correspondiente al valor de  $0,29^\circ$ , equivalente a 0,00506 rad (obtenido de la diferencia de  $26,64^\circ$ - $24,35^\circ$  en la mitad del pico de mayor intensidad, para hallar el ancho del pico) y  $2\theta$  el ángulo de difracción del pico de mayor intensidad del espectro DRX con un valor de  $24,50^\circ$ , equivalente a 0,42761 rad. De esta manera se obtuvo el tamaño aproximado promedio del cristalito de  $\text{WO}_3$  depositado sobre la superficie del sustrato FTO el cual fue de 27,4 nm.

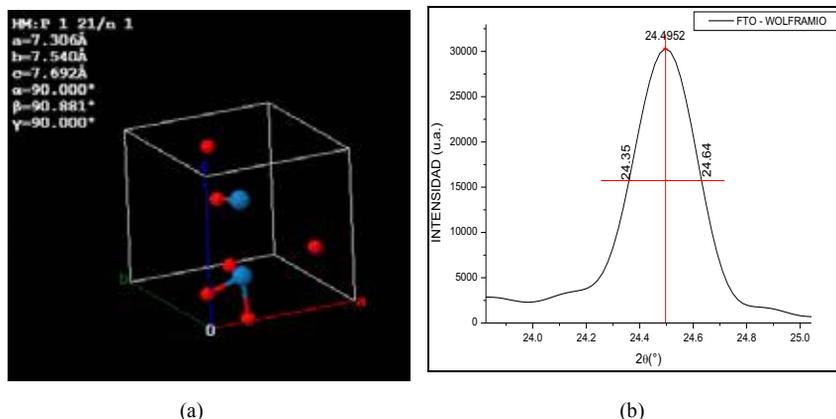


Figura 7. (a) Celda monoclinica para  $WO_3$ , (b) Medición del ancho medio del pico con mayor intensidad de la película de  $(WO_3)_n$  depositada en FTO.

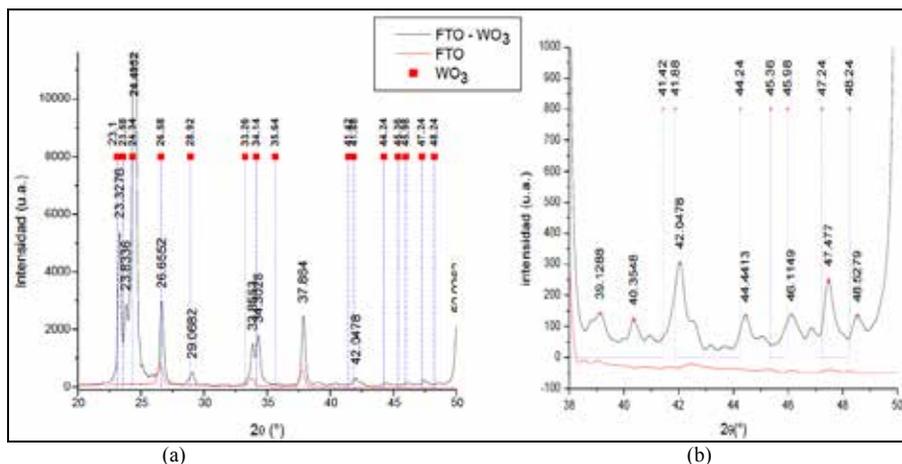


Figura 8. Difractogramas de rayos X de la película de  $(WO_3)_n$  depositada en el FTO y del patrón de  $WO_3$  a un rango de (a)  $20^\circ$  a  $50^\circ$  y (b)  $38^\circ$  a  $50^\circ$

#### 4. Espectroscopía por Energía Dispersiva de Rayos X

Se realizaron análisis por dispersión de energía de rayos X (EDX). En la tabla 1 se muestran los resultados por EDX para la película de  $(WO_3)_n$  depositada en FTO y en acero 316L. El EDX indicó W, O y Sn como los elementos principales en la película de  $(WO_3)_n$  depositada sobre FTO. Para la película depositada de  $(WO_3)_n$  sobre acero se indica la presencia de Fe, O, Cr, W, Ni, C, Mo, Mn y V, metales que están presentes en el acero 316L<sup>16</sup>. Se puede observar que en FTO se tiene un 1,6 % de Sn (que corresponde específicamente a la composición del FTO), 77,7 % de W y 20,7 % de O, lo cual corresponde a la fórmula empírica muy

aproximada a  $WO_3$ . Esto demuestra que se ha logrado depositar una estructura base de  $WO_3$  sobre sus respectivos sustratos.

Dicho cálculo no es posible realizar en la película depositada sobre acero por cuanto los elementos constituyentes del sustrato eclipsan en mucho al porcentaje real de W en la película.

**Tabla 1.** Resultados obtenidos por EDX para las películas de  $(WO_3)_n$  sobre los sustratos.

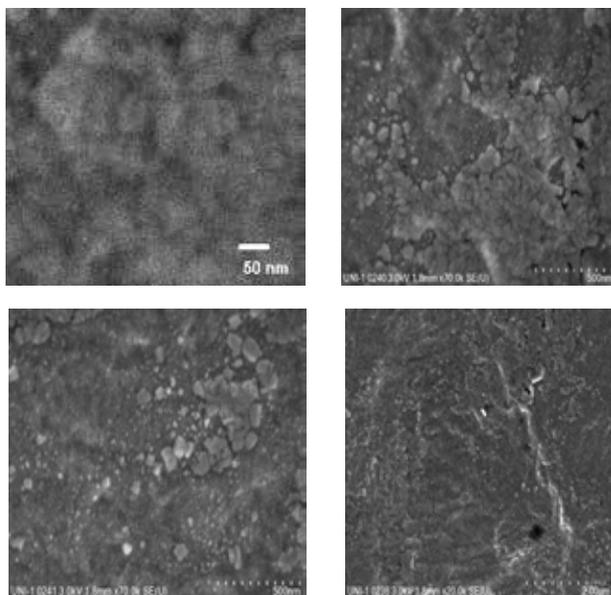
<i>FTO – <math>(WO_3)_n</math></i>		<i>ACERO 316L – <math>(WO_3)_n</math></i>	
Elemento	Porcentaje en masa (%)	Elemento	Porcentaje en masa (%)
W	77,7	Fe	42,6
O	20,7	O	27,9
Sn	1,6	Cr	11,2
		W	8,2
		Ni	5,9
		C	2,2
		Mo	1,1
		Mn	0,8
		V	0,1

### 5. Morfología mediante Microscopía de Barrido Electrónico

Se escogió como muestra representativa a un sustrato de vidrio FTO en la que se había depositado solamente  $(WO_3)_n$  y se tomaron fotografías a distintos voltajes de aceleración. Las fotografías muestran que el tamaño de partícula oscila entre 50 y 100 nm, aproximadamente. Asimismo, se puede notar que no se tuvo uniformidad en el tamaño de las mismas, siendo elevado el grado de polidispersión por simple inspección. Este hecho podría atribuirse a que no se tuvo un control de temperatura adecuado durante la deshidratación del  $(WO_3)_n \cdot nH_2O$  hasta  $(WO_3)_n$  en la mufla. Se puede observar también que se han formado varias capas (películas) sobre el sustrato, las cuales tampoco presentan uniformidad, esto puede deberse a que durante el secado de cada sustrato durante el proceso de dip coating que nos hace suponer que el uso de la pistola de aire caliente no sería el camino adecuado para obtener capas uniformes.

Este análisis morfológico muestra la formación de capas nanoestructuradas adheridas fuertemente al sustrato, por lo que podemos suponer que se trata de películas de  $(WO_3)_n$  soportadas sobre vidrio FTO.

A continuación se muestran algunas fotografías que evidencian lo mencionado.



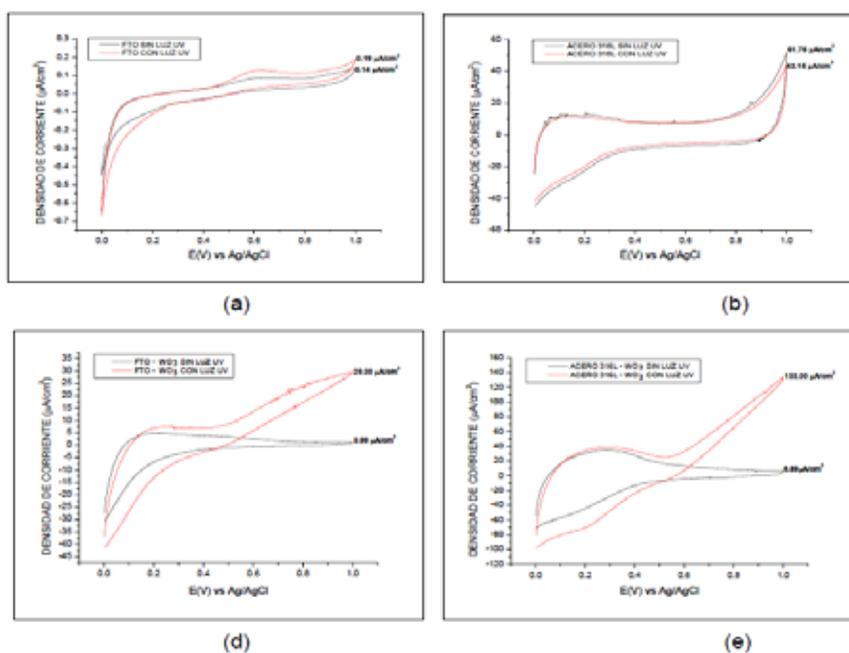
## 6. Voltametría Cíclica de Barrido

Se analizó la respuesta del voltaje vs. corriente para los sustratos puros FTO y acero 316L (sin películas de  $(\text{WO}_3)_n$ ) (figura 9a y 9b), observando que al irradiar radiación UV de 365 nm en la superficie de estos no genera fotocorriente alguna.

Se realizó otra prueba para las películas de  $(\text{WO}_3)_n$  soportadas en los sustratos FTO y acero (figuras 9c y 9d). Cerca a los 0,2 V se observó una banda atribuida a las propiedades electrocromáticas de la película de  $(\text{WO}_3)_n$ . Dependiendo del potencial eléctrico aplicado al W de la película, este se oxidará o reducirá presentando un determinado color (amarillento o azul) de acuerdo al estado de oxidación predominante. En nuestro caso, se obtuvo una coloración azul, correspondiente a un óxido no estequiométrico correspondiente a  $\text{WO}_{2,9}$ .<sup>17</sup>

En el voltagrama del  $(\text{WO}_3)_n$  existe acumulación de  $\text{H}_2$  a 0,2 V debido a una corriente catódica (durante el barrido desde 0 a 1 V) y luego este es desorbido cuando el barrido de potencial va de 1 a 0 V debido a la corriente anódica. Tal efecto fue observado para la película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositada sobre el sustrato de FTO; mientras que en la película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositada sobre el sustrato de acero se observó un pico en la región catódica a 0,2 V, lo cual se debe a la elevada acumulación de  $\text{H}_2$  que es liberado de manera abrupta, indicando que la deposición de  $(\text{WO}_3)_n$  sobre acero tiene comportamiento fotocatalítico distinto, en razón que el pico de oxidación y reducción están bajo el mismo potencial. Esto podría suponer que las propiedades catalíticas del  $\text{WO}_3$  son distintas cuando son soportadas sobre FTO y en acero 316L.

En ausencia de luz y con un potencial superior a los 0,2 V se observó corriente no Faradaica (correspondiente al barrido de 0,4 a 1 V y viceversa), lo cual indica que las especies que se forman al pasar por corriente anódica y catódica son las mismas y están en equilibrio. Cuando la película de  $(\text{WO}_3)_n$  es irradiada con luz UV se produce una corriente Faradaica, lo que demuestra que la superficie se comporta como semiconductor, generando el par electrón - hueco ( $h_{vb}^+$ ,  $e_{cb}^-$ ) que conduce a la formación de radicales oxidrilo ( $\text{OH}\cdot$ ) a nivel superficial. En el momento que la diferencia de potencial se incrementa desde 0 hasta 1 V (corriente anódica) toda la superficie es recubierta de los radicales  $\text{OH}\cdot$ ; pero cuando la diferencia de potencial toma el sentido inverso (de 1 a 0 V) estos radicales  $\text{OH}\cdot$  son liberados de la superficie hacia la solución por el cambio de la polaridad de la corriente (corriente catódica). Para una diferencia de potencial de 1 V, la fotocorriente generada en la película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositada en la superficie de FTO presentó una densidad de corriente eléctrica de  $29 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; mientras que la película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositada en acero 316L arrojó una densidad de corriente eléctrica de  $133 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Esta medida nos indica que el sustrato de acero 316L ayuda evitar la recombinación de los pares ( $h_{vb}^+$ ,  $e_{cb}^-$ ) fotogenerados, colectando de una manera mucho más eficiente el electrón proveniente de la banda de conducción generado por la excitación de parte de la luz UV y al mismo tiempo tenemos más deficiencia de electrones en la banda de valencia, lo cual repercute en mayor cantidad de radicales  $\text{OH}\cdot$  generados. Finalmente, concluimos que, por la generación de estos radicales, el sustrato de acero 316L resulta mejor soporte para la película de  $(\text{WO}_3)_n$  que el sustrato FTO, los mismos que presentan un elevado potencial de oxidación (2,8 V a 25 °C, situado por debajo del flúor) útiles para degradación oxidativa de contaminantes orgánicos en medio acuoso.



**Figura 9.** Voltametría cíclica del sustrato FTO (a), del acero 316L (b), de la película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositada en FTO (d) y la película de  $(\text{WO}_3)_n$  depositada en acero 316L.

## CONCLUSIONES

Las películas de  $(\text{WO}_3)_n$  pudieron ser obtenidas por el método sol-gel empleando la técnica "dip-coating" las mismas que fueron soportadas en sustratos de vidrio conductor (FTO) y placas de acero 316L.

La caracterización por DRX nos mostró una estructura predominantemente monoclinica en ambos sustratos, obteniendo datos que se ajustan bastante bien a la estructura del  $\text{WO}_3$ , lo cual fue también confirmado por espectroscopía FTIR y Raman, que adicionalmente confirmaron enlaces W-O-W correspondientes a una estructura polimérica de  $(\text{WO}_3)_n$ .

El análisis por EDX nos confirmó la presencia de W en cantidad suficiente para determinar la fórmula empírica de  $\text{WO}_3$ .

El análisis morfológico por SEM nos mostró un tamaño de partícula de promedio que oscila entre los 50 y 100 nm y la formación de películas de  $(\text{WO}_3)_n$  fuertemente adheridas al sustrato de vidrio FTO.

Los voltagramas obtenidos de las películas de  $(\text{WO}_3)_n$  irradiadas con luz UV de 365 nm indicaron que el sistema  $(\text{WO}_3)_n$  - sustrato de acero 316L es el mejor candidato para ser usado en la degradación fotoelectrocatalítica oxidativa de especies orgánicas, en razón de presentar mayor densidad de corriente eléctrica generada ( $133 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) lo cual indicaría que la recombinación del par electrón - hueco es menos eficiente que el sistema  $(\text{WO}_3)_n$  - sustrato vidrio conductor FTO, cuya densidad de corriente fue de solo  $29 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Ingeniería por la colaboración en la prestación de equipos para la obtención de los difractogramas de Rayos X y los espectros FTIR y Rama, el análisis por EDS y el análisis morfológico por SEM, especialmente al Dr. Clemente Luyo por la realización de este último análisis.

Asimismo, agradecen profundamente a la Universidad de Lima por las instalaciones de sus laboratorios y el apoyo perenne para la realización de este trabajo de investigación financiado con recursos propios de la Universidad y el FONDECYT - CONCYTEC.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Dawar L, Joshi JC. Semiconducting Transparent Thin Films: Their Properties and Applications. *J Mat Sci.* 1984; 19(1): 1-23.
2. Albella JM. Láminas Delgadas y Recubrimientos, Preparación, Propiedades y Aplicaciones. Madrid: Ed. CSIC; 2003.

3. Alarcón H. Obtención de Películas Delgadas de óxido de Tungsteno vía Proceso Sol-Gel. [Tesis de Licenciatura en Química]. Lima: Universidad Nacional de Ingeniería; 1998.
4. Cantalini C, Atashbar MZ, Li Y, Ghantasala MK, Santucci S, Woldarski W, et al. Characterization of sol-gel prepared  $WO_3$  thin films as a gas sensor. *J Vac Sci Technol A*. 1999; 17(4):1873.
5. Medina A. Síntesis y Caracterización de Películas de Óxido de Tungsteno con Adición de Fósforo y Estaño. Aplicaciones como Materiales Electrocrómicos. [Tesis de Licenciatura en Química]. Lima: Universidad Nacional de Ingeniería; 1998.
6. Brinker J, Sherer GW. Sol-Gel. San Diego: Science Academic Press; 1990.
7. Pope MT. Heteropoly and Isopoly Oxometals. Berlin: Springer-Verlag; 1983.
8. Brinker J. Hydrolysis and condensation of Silicates: Effects on Structure. *J Non-Cryst Solids*. 1988; 100: 31-50.
9. J. Brinker C. Sol-Gel Transition in simple silicates. *Journal of NonCrystalline Solids*. 48:47 (1982).
10. Díaz-Reyes J, Dorantes-García V. Obtaining of films of tungsten trioxide ( $WO_3$ ) by resistive heating of a tungsten filament. *Superf Vacío*. 2008; 21(2): 12-17.
11. Daniel F, Desbat B, Lassegues JC, Gerand B, Figlarz M. Infrared and Raman study of  $WO_3$  tungsten trioxides and  $WO_3 \cdot xH_2O$  tungsten trioxide hydrates. *J Solid State Chem*. 1987; 67(2): 235-247.
12. Loopstra BO, Rietveld HM. Further refinement of the structure of  $WO_3$ . *Acta Cryst B*. 1969; 25: 1420-1421.
13. Yogamalar R, Srinivasan R, Vinu A, Ariga K, Bose AC. X-ray peak broadening analysis in ZnO nanoparticles. *Solid State Commun*. 2009; 149(43-44): 1919-1923.
14. Rezaee O, Mahmoudi Chenari H, Ghodsi FE, Ziyadi H. Preparation of PVA nanofibers containing tungsten oxide nanoparticle by electrospinning and consideration of their structural properties and photocatalytic activity. *J Alloys Compd*. 2017; 690: 864-872.
15. Khorsand Zak A, Majid WH, Abrishami ME, Yousefi R. X-ray analysis of ZnO nanoparticles by Williamson-Hall and size-strain plot methods. *Solid State Sci*. 2011; 13: 251-256.
16. Donnelly E, Weafer FM, Connolley T, McHugh PE, Bruzzi MS. Experimental investigation into the size effect on the microscale fatigue behaviour of 316L stainless Steel. *Int J Fatigue*. 2017; 95; 1-7.
17. Dorantes-García V, Díaz-Reyes J, Pérez-Benítez A. Síntesis sencilla de óxido de tungsteno (VI) a partir del filamento de un foco. *Educación Química*. 2008; 19(4): 341-348.

## **OPTIMAL CONDITIONS FOR OXIDIZING PHENOL IN WATER BY FENTON AND PHOTO-FENTON PROCESSES**

H. A. Blas López<sup>a</sup>, G. H. Lopes<sup>a</sup>, A. C. Silva Costa Teixeira<sup>b</sup>,  
C. E. Flores Barreda<sup>a</sup>, P. A. Pantoja<sup>\*a</sup>

### **ABSTRACT**

Phenol can be degraded to almost 100 % within a few minutes via Fenton and photo-Fenton processes. Its degradation and the ratio of initial molar concentrations of oxidant and catalyst increase in inverse senses, and a ratio of 38.4 was optimal for aqueous solutions contaminated with 20 ppm of phenol. In addition to this, the use of ultraviolet-A light enhanced degradation when compared to shorter wavelengths.

**Key words:** Advanced oxidation, Fenton, photocatalysis, organic pollutants, wastewater, phenol.

## **CONDICIONES ÓPTIMAS PARA OXIDAR FENOL EN AGUA VÍA LOS PROCESOS FENTON Y FOTO-FENTON**

### **RESUMEN**

Fenol puede ser degradado a casi 100 % en pocos minutos vía los procesos Fenton y foto-Fenton. Su degradación y la relación entre las concentraciones molares iniciales de oxidante y catalizador utilizadas aumentan en sentidos inversos, y una relación de 38,4 fue óptima para soluciones acuosas contaminadas con 20 ppm de fenol. Asimismo, el uso de luz ultravioleta del tipo A aumentó la degradación comparado a menores longitudes de onda.

**Palabras clave:** Oxidación avanzada, Fenton, fotocatálisis, contaminantes orgánicos, aguas residuales, fenol.

### **INTRODUCTION**

Phenols are among the most toxic organic pollutants<sup>1</sup>. In Peru, surface waters with phenolic content above 0.003 ppm are not allowed to be made drinkable by simple disinfection<sup>2</sup>. Lakes

---

<sup>a</sup> Department of Chemical Engineering, Universidad de Ingeniería y Tecnología (UTEC), Jr. Medrano Silva 165, Barranco, Lima 04, Peru, paraujo@utec.edu.pe.

<sup>b</sup> Department of Chemical Engineering, Polytechnic School, Universidade de São Paulo (USP), Av. Professor Luciano Gualberto, Travessa 3, 380, São Paulo/SP 05508-900, Brazil.

and rivers ought not to surpass 2.56 ppm and coastal waters must be kept below 5.8 ppm<sup>2</sup>. Yet, phenols are major starting compounds in industrial chains leading to major products such as plastics, dyes, binders, adhesives, and biocides<sup>3</sup>.

These non-biodegradable organics may not respond to biological treatment, and their transfer from one phase to another, as for instance in adsorption or flocculation, is not a final solution for their elimination<sup>4,5</sup>. Fortunately, they can be degraded by advanced oxidation processes (AOPs). Nevertheless, AOPs are not broadly used in Peru despite their potential, and little seems to have been published on local attempts<sup>6,7</sup>.

The kinetics of Fenton's AOP is complex and extensively described in the literature<sup>3,4,8,9</sup>. Essentially, a transition-metal ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in acidic aqueous medium catalyzes the decomposition of an oxidant ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) into unselective free radicals ( $\text{HO}^\cdot$ ) as in the reaction  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}^\cdot$ . In turn, these radicals oxidize organic pollutants by generating organic radicals<sup>4,8</sup>. If reactants are present in sufficient concentrations<sup>8</sup>, the organic radicals react with  $\text{HO}^\cdot$  until their complete mineralization to  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CO}_2$ . Interestingly, pollutant degradation increases under electromagnetic radiation due to two new phenomena<sup>4,5,10,11</sup>. One is the photo-reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  under near-ultraviolet and visible lights, what regenerates  $\text{Fe}^{2+}$  and form new (pollutant) radicals  $\text{L}^\cdot$  according to the reaction  $\text{Fe}^{3+} + \text{L} + h\nu \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{L}^\cdot$  (where  $h$  represents Planck's constant and  $\nu$  is the wave frequency). The other is the photolysis of  $\text{H}_2\text{O}_2$  under ultraviolet irradiation to give more  $\text{HO}^\cdot$  radicals as represented by the reaction  $\text{H}_2\text{O}_2 + h\nu \rightarrow 2 \text{HO}^\cdot$ . This process is therefore termed photo-Fenton.

The multistep kinetics of the  $\text{Fe}^{2+} / \text{H}_2\text{O}_2$  chemistry is affected by numerous experimental factors. For this reason, the reaction time, the pH, the relative concentrations of pollutant, oxidant and catalyst, the temperature, the wavelength and other conditions are optimized experimentally<sup>4,8-14</sup>. A consensus seems to have been reached for pH only. Indeed, more  $\text{Fe}^{2+}$  and less of unreactive, non-dissolvable precipitates of ferric (oxy)hydroxides are formed below pH 3, but scavenging of  $\text{HO}^\cdot$  by  $\text{H}^+$  combined with unfavorable iron speciation and auto-decomposition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  all reduce pollutant peroxidation below pH 2.8<sup>4,8,9,11</sup>. As for the values recommended for the ratio of initial concentrations of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , deviations from stoichiometric proportions by one or even two orders of magnitude are reported<sup>9-11,13,14</sup>. Finally, photo-Fenton efficiency is wavelength-dependent<sup>4,5,9-11</sup>.

In the Fenton scheme, phenol is hydroxylated to hydroquinone and then oxidized to quinone before its further oxidation to aliphatic acids<sup>4,12</sup> which are relatively stable towards  $\text{HO}^\cdot$  unless irradiated. Under irradiation,  $\text{Fe}^{3+}$  catalyzes light-induced reactions which eventually enhance mineralization<sup>4,12</sup>. The current work presents an experimental method and optimal conditions for degrading phenol in diluted aqueous solutions and contributes to consolidating the application of AOPs in Peru.

## EXPERIMENTAL

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 % in mass, J. T. Baker) at 0.3 mol L<sup>-1</sup> and FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (99 % purity, Scharlau) at 0.1 mol L<sup>-1</sup> previously dissolved in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 %, J. T. Baker) at 0.1 mol L<sup>-1</sup> were used. Phenol (99.6 % purity, J. T. Baker) at 20 ppm was the target solution. NaOH (99 % purity, Macron) in aqueous solution at 1 mol L<sup>-1</sup> was added to analytical samples for inhibiting phenol degradation and so allowing for analyses to be performed. Degradation experiments were carried out in a magnetically stirred photochemical batch reactor (RFS-500, Alphatec, Brazil) of volume of 1 L equipped with a jacket for temperature control and a pH meter. For photo-Fenton tests, the reactor's tubular ultraviolet-A or ultraviolet-C lamp (9 W, OSRAM, South Korea) or ultraviolet-B (9W, Philips, Poland) was turned on. Phenol was quantified in all samples via the 4-aminoantipyrine colorimetric method<sup>15</sup> with help of an ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-2600, Shimadzu, Japan).

For each test, 1 L of phenol solution was added to the reactor. Small volumes of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 50 % helped keep pH at 2.91 ± 0.02. Then, the desired amounts of catalyst and oxidant solutions were added all at once and the mixture let react at ambient temperature under vigorous stirring and isolated from ambient light. Experiments were repeated at least 3 times. Four samples of 10 mL were analyzed per test; they corresponded to reaction times of 0, 2, 5 and 10 minutes. A total of 100 µL of the inhibitor solution was systematically added to each sample immediately after its removal from the reactor in addition to the solutions necessary for the colorimetric analyses. Analytes would then rest for 15 minutes before being analyzed spectrophotometrically at 500 nm (wavelength determined during previous calibration).

## RESULTS AND DISCUSSIONS

Results focus on the percentage of phenol degradation (X), defined as  $X=100 \left( \frac{[C]_0 - [C]}{[C]_0} \right)$ , where [C]<sub>0</sub> is the initial pollutant concentration and [C] is its concentration at any reaction time t. Table 1 synthesizes mean results after 10 minutes of reaction and reveals that all processes under all experimental conditions are very effective in destroying phenol. Furthermore, the table shows that photo-Fenton was able to oxidize the target pollutant up to 9 percentage points more than Fenton at similar operating conditions. Generically, average degradations ranged from 85.3 % to 96.4 % for Fenton and from 91.3 % to 99.7 % for photo-Fenton samples.

**Table 1.** Average phenol degradations after 10 minutes. UV-A wavelengths lie within 400–315 nm, UV-B within 315–280 nm and UV-C within 280–100 nm.

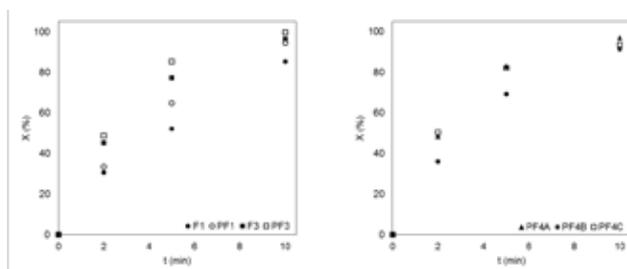
Label	Process	$[\text{Fe}^{2+}]_0$ ( $10^{-5}$ mol L $^{-1}$ )	$[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ ( $10^{-3}$ mol L $^{-1}$ )	$\frac{[\text{H}_2\text{O}_2]_0}{[\text{Fe}^{2+}]_0}$	Light	X (%)
F1	Fenton	5.5	3.0	54.5	-	85.3
PF1	Photo-Fenton				UV-A	94.3
F2	Fenton	6.0	3.0	50.0	-	89.3
PF2	Photo-Fenton				UV-A	95.8
F3	Fenton	7.8	3.0	38.4	-	96.4
PF3	Photo-Fenton				UV-A	99.7
PF4A	Photo-Fenton	6.0	2.4	40.0	UV-A	97.3
PF4B					UV-B	91.3
PF4C					UV-C	93.3

Higher degradations were obtained with lower ratios  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{Fe}^{2+}]_0$ . Indeed, scavenging of HO $^{\cdot}$  radicals occur with high concentrations of H $_2$ O $_2$ <sup>4,9-11</sup>. It is also possible to note that UV-A lights gave better results than the other lamps, but more experiments are necessary for elucidating the behavior of all irradiated compounds<sup>4</sup>.

Degradation was always lower for Fenton experiments compared to photo-Fenton. Anyway, X increased always fast whenever an experiment was launched. As seen in Fig. 1, up to half of phenol could be destroyed during the first 2 minutes in some cases. The rate of degradation diminished from this instant on but remained elevated, such that photo-Fenton and optimum Fenton experiments (F3) exceeded 70% or even 80% degradation within 5 minutes. In order to evaluate the extent of mineralization, it would have been insightful to measure the total organic carbon contents of the treated samples and to compare them to those of the untreated samples. However, these analyses were not carried out in this study.

## CONCLUSIONS

The effectiveness of Fenton and photo-Fenton AOPs for degrading phenol above 90 % and even close to 100 % in aqueous solutions of concentration 20 ppm is verified. Ultraviolet-A light is able to enhance degradation, but nonirradiated Fenton treatments with a ratio of initial molar concentrations of 38.4 yield equivalent degradations. Unless extremely high degradations are necessary, either treatment may be selected; in such cases, economic analyses should help decide which process is preferable. This study is a bedrock for exploring the application of the techniques to challenging phenol-containing wastewaters as is the case in niche Peruvian industries. Such studies are in course.

**Figure 1.** Evolution of the average phenol degradation as the reaction time increases.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank INNÓVATE PERÚ for funding this work (contract 375-PNIPC-PIAP-2014) and O. D. Matallana, M. E. Quintana Cáceda and O. K. Terreros Delgadillo for their support.

## REFERENCES

1. Bruce RM, Santodonato J, Neal MW, Summary Review of the Health Effects Associated With Phenol. *Toxicol Ind Health*. 1987; 3: 535-568.
2. MINAM. Modifican los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua y establecen disposiciones complementarias para su aplicación. [Internet]. Decreto Supremo 015-2015-MINAM, Peru, 2015. [accesado 12 set 2017]. Disponible en: <http://www.ana.gob.pe/sites/default/files/normatividad/files/ds-ndeg-015-2015-minam.pdf>
3. Rappoport Z. *The Chemistry of Phenols*. Chichester, UK: Wiley; 2003.
4. Pignatello J, Oliveros E, MacKay A. Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2006; 36(1): 1-86.
5. Nogueira KRB, Nascimento CAO, Guardani R, Texeira ACSC. Feasibility Study of a Solar Reactor for Phenol Treatment by the Photo-Fenton process in Aqueous Solution. *Chem Eng Technol*. 2012; 35(12): 2125-2132.
6. Salas G, Ale N. Tratamiento de las aguas residuales de una refinería de petróleo por oxidación avanzada (AOX), usando el reactivo de Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>). *Rev Per Quím Ing Quím*. 2008; 11(2): 12-18.
7. Tinoco OR, Medina AM, Zapata H. Tratamiento de efluentes textiles con luz ultravioleta solar. *Rev Fac Ing Ind*. 2011; 14(2): 9-15.
8. Neyens E, Baeyens J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *J Hazard Mater*. 2003 Mar 17; 98(1-3): 33-50.
9. Babuponnusami A, Muthukumar K. A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. *J Environ Chem Eng*. 2014; 2(1): 557-572.
10. Pérez M, Torrades F, García-Hortal JA, Domènech X, Peral J. Removal of organic contaminants in paper pulp treatment effluents under Fenton and photo-Fenton conditions. *Appl Catal B-Environ*. 2002; 36(1): 63-74.
11. Pouran SR, Abdul Aziz AR, Daud WMAW. Review on the main advances in photo-Fenton oxidation system for recalcitrant wastewaters. *J Ind Eng Chem*. 2015; 21: 53-69.
12. Yavuz Y, Savas Koparal A, Bakur Ögütveren Ü. Phenol Removal through Chemical Oxidation using Fenton Reagent. *Chem Eng Technol*. 2007; 30(5): 583-586.
13. Kavitha V, Palanivelu K. The role of ferrous ion in Fenton and photo-Fenton processes for the degradation of phenol. *Chemosphere*. 2004; 55(9):1235-1243.
14. Will IBS, Moraes JEF, Teixeira ACSC, Nascimento CAO. Photo-Fenton degradation of wastewater containing organic compounds in solar reactors. *Sep Purif Technol*. 2004; 34(1-3): 51-57.
15. Emerson E, Kelly K. The condensation of aminoantipyrene. VI. A study of the effect of excess base on the reaction of amino-antipyrene with phenolic compounds in the presence of oxidizing agents. *J Org Chem*. 1948; 13(4): 532-534.

## ESTUDIO QUÍMICO DE LAS HOJAS DE *Datura candida* (PERS.) SAFF

Billy Cabanillas Amado<sup>a</sup>, Víctor Reyna Pinedo<sup>a\*</sup> y Virginia Torpoco Carmen<sup>a</sup>

### RESUMEN

De las hojas de *Datura candida* (Pers.) Saff, colectadas en Huancabamba (Piura), se aislaron escopolamina (**1**) y norescopolamina (**2**) como los principales alcaloides, los cuales fueron identificados mediante el análisis de sus espectros de masas y de RMN. Adicionalmente, se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios y la cuantificación de alcaloides presentes en las hojas<sup>1</sup>.

**Palabras clave:** *Datura candida*, alcaloides tropanicos, escopolamina, norescopolamina.

## CHEMICAL STUDY OF THE LEAVES OF *Datura candida* (PERS.) SAFF

### ABSTRACT

From of leaves of *Datura candida* (Pers.) Saff collected in Huancabamba (Piura) were isolated scopolamine (**1**) and norscopolamine (**2**) as principal alkaloids. The structures were determinate by analysis of the MS and NMR data. Furthermore, the qualitative analysis and quantitative determination of alkaloids were performed.

**Key words:** *Datura candida*, tropane alkaloids, scopolamine, norscopolamine.

### INTRODUCCIÓN

El género *Datura*, perteneciente a la familia *Solanaceae*, incluye cerca de nueve especies principalmente distribuidas en América central y del sur<sup>2</sup>. Estas especies son consideradas una rica fuente de alcaloides tropanicos de interés medicinal, siendo los principales la escopolamina y la hiosciamina, los cuales son utilizados como agentes anticolinergicos que actúan sobre el sistema nervioso parasimpático<sup>3</sup>. No obstante que se ha conseguido la síntesis total de estos alcaloides, hasta la fecha la escopolamina y varios alcaloides tropanicos son producidos principalmente en plantas con ayuda de la ingeniería genética<sup>3,4</sup>.

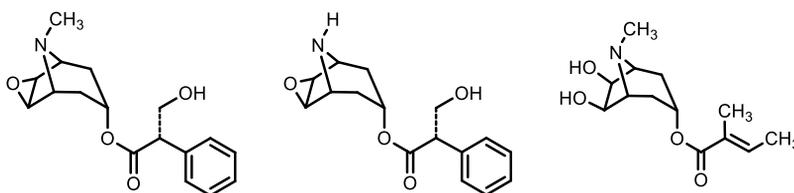
---

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú.  
vrey26@yahoo.es

Las especies del género *Datura* son utilizadas tradicionalmente como plantas ornamentales y también son empleadas en la medicina tradicional. *Datura candida* (o *Brugmansia candida*) es una planta utilizada tradicionalmente para tratar traumatismos, dolores reumáticos, diarreas o úlceras<sup>5,6</sup>.

En la bibliografía se reportan estudios realizados a ejemplares de *Datura candida* cultivados en Australia e Inglaterra que difieren en la composición de alcaloides<sup>7-9</sup>. En todos los casos se reporta a la escopolamina (1) como el alcaloide principal (figura 1).

A continuación, se describe el estudio cualitativo, cuantitativo y el aislamiento e identificación de los dos principales alcaloides presentes en las hojas de *D. candida*.



**Figura 1.** Estructuras de la escopolamina (1), norescopolamina (2) y meteloidina (3).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales y equipos

El contenido total de alcaloides se determinó con un potenciómetro Mach EC20. Los espectros de masas fueron registrados en un espectrómetro Waters-Micromass. Las cromatografías en columna se realizaron sobre óxido de aluminio Merck 90 de grados de actividad II-III y silica gel SDS 60A (35-70  $\mu\text{m}$ ). Para las cromatografías en capa fina se utilizaron placas de silica Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 0,2 mm (Riedel de Haën), mientras que para las cromatografías en capa preparativa se emplearon placas de silica F<sub>254</sub>, 2mm (Merck). Se utilizó el reactivo de Dragendorff modificado por Munier<sup>10</sup> como revelador. El espectro de masas se registró en un espectrómetro de masas Waters – Micromass Tipo ESI – TOF, modo de ionización ESI / Alta Resolución (Laboratorio de Espectrometría del ICSN-CNRS); los espectros de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C HMQC y <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C HMBC en un equipo RMN Bruker AC-300 (300 MHz) en el Institute de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS), de Gif-Sur-Yvette, Francia.

### Material vegetal

Las hojas de *D. candida* se colectaron en la provincia de Huancabamba, departamento de Piura, en julio de 2001 y fueron identificadas por la Blga. Joaquina Albán Castillo (UNMSM). Los catálogos de los especímenes fueron depositados en el Museo de Historia Natural de la Universidad Mayor de San Marcos.

Las hojas se secaron en estufa a 40 °C, durante cinco días. La muestra seca se pulverizó a grano fino en un molino doméstico.

### **Análisis cualitativo**

El análisis cualitativo (marcha fitoquímica) se realizó por triplicado según el método descrito por Rondina & Coussio<sup>11</sup>.

### **Análisis cuantitativo de alcaloides**

El contenido total de alcaloides en las hojas de *D. candida* se determinó mediante el método de titulación potenciométrica propuesto por Hoet & Ríos<sup>12</sup>.

### **Aislamiento de alcaloides**

Las hojas de *D. candida* secas y pulverizadas (150 g) se desengrasaron con n-hexano (300 mL x 3) mediante agitación continua. El solvente se eliminó mediante filtración y la muestra vegetal se secó a temperatura ambiente. El sólido resultante se maceró en MeOH (300 mL x 3) durante 24 h, luego se filtró y el solvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose un extracto sólido de color verde oscuro (12,6 g). El extracto se disolvió en 20 mL de CHCl<sub>3</sub> y se extrajo con HCl 1N (100 mL x 3). Las soluciones ácidas obtenidas se juntaron y se alcalinizaron con NH<sub>3</sub> 15N (110 mL) hasta alcanzar un pH 11, y luego se extrajeron con CHCl<sub>3</sub> (100 mL x 3) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL x 2). Ambos extractos orgánicos fueron combinados y el solvente fue evaporado obteniéndose el extracto bruto de alcaloides (EBA) bajo la forma de una resina de color marrón (153 mg). Este mismo procedimiento de extracción fue repetido obteniéndose cuatro fracciones adicionales (119, 135, 1964 y 827 mg, respectivamente). Del cuarto extracto se tomaron 1560 mg que fueron fraccionados mediante cromatografía en columna sobre óxido de aluminio utilizando una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH de polaridad creciente según el método descrito por Griffin<sup>7</sup>, obteniéndose en total siete fracciones (A<sub>1-7</sub>). Sin embargo, la mayor parte del extracto se eluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sin mayor separación, obteniéndose 1190 mg en la fracción A<sub>1</sub>. Debido a ello, se decidió realizar una segunda cromatografía en columna utilizando sílica gel como absorbente. Para ello, se tomó una parte de esta fracción A<sub>1</sub> (482 mg) y la columna se eluyó con una mezcla de polaridad creciente de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, obteniéndose en total cuatro fracciones (A<sub>1</sub>B<sub>1-4</sub>). Las dos fracciones con mayor masa, A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> (195 mg) y A<sub>1</sub>B<sub>3</sub> (83 mg), mostraron una composición similar según sus espectros <sup>1</sup>H-RMN. Por ello, toda la fracción A<sub>1</sub>B<sub>3</sub> (83 mg) y un aparte de la fracción A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> (70 mg) fueron purificadas, por separado, mediante cromatografía en capa fina preparativa utilizando CHCl<sub>3</sub>-EtOH-NH<sub>3</sub> (100:10:1) como eluente, consiguiéndose aislar dos compuestos, escopolamina **1** (65 mg) y norescopolamina **2** (18 mg), como resinas de color pardo.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Análisis cualitativo**

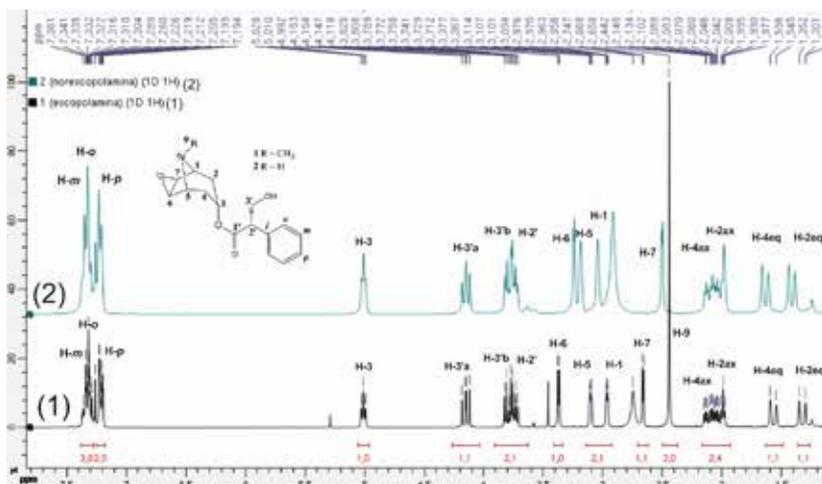
El análisis cualitativo mostró que las hojas de *D. candida* contienen los siguientes grupos de compuestos: aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos libres, triterpenos y esteroides, alcaloides, catequinas, taninos y saponinas.

### Análisis cuantitativo de alcaloides

La determinación del contenido del total de alcaloides arrojó un valor de 0,45 % en base a muestra seca. En la literatura se reportan contenidos de alcaloides muy variables. En 1966, Griffin<sup>7</sup> reporta un contenido total de alcaloides de 0,62 % en las hojas de *D. candida* cultivada en Brisbane (Australia). Posteriormente, Bristol *et al.*<sup>8</sup> encontraron que las partes aéreas de muestras de *D. candida* (Pers.) Saff., cultivadas en Nottingham (Inglaterra) y en Hawaii (EE. UU), contienen cantidades de alcaloides que varían entre 0,30 – 0,43 %.

### Identificación estructural de los principales alcaloides

El compuesto **1**, mostró en su espectro de masas ESI-MS un pico de ion molecular a  $m/z$  304  $[M+H]^+$  correspondiente con la fórmula  $C_{17}H_{22}NO_4$ . El espectro de  $^1H$ -RMN en  $CDCl_3$  (figura 2) exhibe en el rango  $\delta_H$  0 - 5 ppm la presencia de un grupo metilo, tres metilenos y seis metinos, y en el rango a  $\delta_H$  7,19 – 7,37 ppm muestra los cinco protones aromáticos del anillo bencénico monosustituido. Los valores exactos de  $\delta_H$  de cada uno de estos protones están indicados en la tabla 1.



**Figura 2.** Espectros de  $^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ) de la escopolamina (**1**) y la norescopolamina (**2**) aislados de las hojas de *D. candida*.

El espectro de  $^{13}C$ -RMN muestra una señal que indica la presencia de un carbonilo de una función éster a  $\delta_C$  171,9 ppm. Asimismo, la presencia de solo cuatro señales a  $\delta_C$  135,6, 128,1, 129,0 y 128,0 ppm afianza la hipótesis de la presencia del anillo aromático. Esta suposición sería luego confirmada por el análisis de los espectros COSY, HMBC y HSQC. Las correlaciones observadas en estos espectros permitieron también determinar la existencia de un anillo de tropano como parte de la molécula. De esta manera se logró determinar que la estructura del compuesto **1** corresponde a la escopolamina. De igual manera, se verificó que los desplazamientos químicos observados en los espectros de  $^1H$ -RMN y  $^{13}C$ -RMN están en concordancia con aquellas correspondientes a la escopolamina publicadas por Sarazin *et al.*<sup>13</sup>.

**Tabla 1.** Datos  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz) en  $\text{CDCl}_3$  para la escopolamina (**1**) y norescopolamina (**2**).

Numeración del H	<b>1</b>		<b>2</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ , mult., (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	2,98, 1H, dd (4,0, 2,0) 1,34, 1H, d (15,3) eq	57,7	2,98, 1H, dd (4,0, 3,5) 1,35, 1H, d (15,5) eq	53,9
2	2,03, 1H, ddd, (15,3, 5,4, 4,0) ax	30,7	1,95, 1H, ddd, (15,5, 5,1, 4,0) ax	31,0
3	5,02, 1H, t (5,4) 1,58, 1H, d (15,0) eq	66,9	4,95, 1H, t (5,1) 1,58, 1H, d (15,1) eq	66,9
4	2,12, 1H, ddd, (15,0, 5,4, 4,0) ax	30,9	2,05, 1H, ddd, (15,1, 5,1, 4,0) ax	31,2
5	3,12, 1H, dd, (4,0, 2,0)	57,8	3,13, 1H, dd (4,0, 3,5)	54,3
6	3,38, 1H, d (3,0)	56,4	3,19, 1H, d (2,9)	53,4
7	2,67, 1H, d (3,0)	55,9	2,90, 1H, d (2,9)	51,8
9	2,45, 3H, s	42,1	-	-
1'	-	171,9	-	171,8
2'	3,75, 1H, dd (8,6, 5,3)	54,3	3,68, 1H, dd (8,5, 5,1)	51,7
3'b	3,81, 1H, dd, (10,6, 5,3)	64,0	3,74, 1H, dd (10,7, 5,1)	63,9
3'a	4,16, 1H, dd, (10,6, 8,6)		4,09, 1H, dd (10,7, 8,5)	
4'	2,76, 1H, s	-	2,92, 1H, s	-
<i>i</i>	-	135,6	-	135,7
<i>o</i>	7,31, 2H, d (1,8)	128,1	7,31, 2H, d (1,8)	128,1
<i>m</i>	7,34, 2H, dd (7,3, 1,8)	129,0	7,34, 2H, dd (7,3, 1,8)	129,0
<i>p</i>	7,22, 1H, dd (7,8, 1,8)	128,0	7,22, 1H, dd (7,8, 1,8)	128,0

El compuesto **2** exhibió en su espectro de masa ESI-MS un pico de ion molecular a  $m/z$  290  $[\text{M}+\text{H}]^+$  concordante con la fórmula  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ . Sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN mostraron similitud con aquellos para la escopolamina, excepto por las señales a  $\delta_{\text{H}}$  2.45 ppm y  $\delta_{\text{C}}$  42.1 ppm. El análisis de las correlaciones mostradas sobre los espectros COSY, HMBC y HSQC permitió determinar que el compuesto **2** es la norescopolamina.

Los alcaloides aislados en las diferentes muestras de *D. candida* reportados en la literatura, también presentan variación. La muestra estudiada por Griffin<sup>7</sup> contiene como alcaloides principales escopolamina y meteloidina, junto con pequeñas cantidades de norescopolamina y norhiosciamina. Bristol *et al.*<sup>8</sup> encontraron que las partes aéreas de *D. candida* (Pers.) Saff., contienen principalmente escopolamina, además de pequeñas cantidades de norescopolamina, meteloidina, atropina, oscina y noratropina. Estos resultados indican que existe poca diferencia cualitativa entre los alcaloides de esta planta y de la especie estrechamente relacionada de *D. candida* sens. lat. publicada por Griffin. Por otro lado, Evans & El Imann<sup>9</sup> estudiaron las partes aéreas de una muestra *D. candida*, denominada “Flinthan Hall” y aislaron escopolamina como el alcaloide principal junto con otros alcaloides, pero no menciona la presencia de

noescopolamina ni meteloidina como en los casos anteriores. Estos resultados tan diferentes se explican si se tiene en cuenta que la especie *D. candida* es una planta que en el proceso de su cultivo puede ser modificada taxonómicamente, alterando la forma de sus hojas, flores y frutos, cambios que se dan también a nivel citológico y en su composición química, por lo que estos diferentes “cultivares” resultan tan diferenciados en su composición química.

La identificación de escopolamina y noescopolamina como los principales alcaloides en la muestra de *D. candida* sugiere cierta similitud en cuanto a la composición de las muestras de Griffin y Bristol. El buen contenido de alcaloides (0,45 %) y la identificación de la escopolamina como el principal alcaloide en nuestra muestra de *D. candida*, sustenta el uso de esta planta como una potencial fuente natural de este alcaloide para su explotación comercial de manera similar como sucede en otros países<sup>4</sup>. Además, la identificación de la noescopolamina como el segundo alcaloide mayoritario resulta importante, dado que la escopolamina puede sintetizarse a partir de este en una sola etapa<sup>14</sup>.

## CONCLUSIONES

A partir de las hojas de *D. candida*, colectada en Perú, se aislaron escopolamina y noescopolamina como los alcaloides principales, los cuales fueron identificados mediante sus espectros de masas y de resonancia magnética nuclear. En el análisis cualitativo de las hojas se verificó la presencia de: aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos libres, triterpenos y esteroides, alcaloides, catequinas, taninos y saponinas. Asimismo, se determinó que las hojas contienen un porcentaje de alcaloides totales de 0,45 %.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al señor Francisco Guerrero P., herbolario residente en la ciudad de Huancabamba (Piura, Perú) por el apoyo en la colecta del material vegetal; a la Dra. Biol. Joaquina Albán C. (Museo de Historia Natural, Universidad Nacional Mayor de San Marcos) por la determinación botánica del material vegetal; al Dr. Christian Marazano, Director de Investigación, y al Dr. Bernard Delpech, investigador, por el apoyo y facilidades brindadas al Bach. Billy Cabanillas A., en el Institute de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS), de Gif-Sur-Yvette, Francia, para la purificación cromatográfica de los extractos de alcaloides, así como para la obtención de los espectros de masas y de resonancia magnética nuclear <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C HMQC y <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C HMBC; al Instituto General de Investigación de la UNI y al Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias – UNI, por el apoyo económico que nos brindaron para la realización de este trabajo de investigación, desde la colecta del material vegetal hasta la obtención de los extractos de alcaloides.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cabanillas B. Estudio químico de las hojas de la misha rastreira (*Datura candida*), [Tesis de Licenciatura] Lima, Perú: Universidad Nacional de Ingeniería; 2008.
2. Albrecth K. Tropical Flowering Plants: a guide to identification and cultivation. Portland, OR: Timber Press. Inc.; 2003.
3. Hashimoto T, Yun J-D, Yamada Y. Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. *Phytochemistry*. 1993; 32 (3): 713-718.
4. Palazón J, Navarro-Ocaña A, Hernandez-Vazquez L, Hossein M. Application of metabolic engineering to the Production of scopolamine. *Molecules*. 2008; 13(8): 1722-1742.
5. Bussmann RW, Sharon D. Traditional medicinal plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. *J Ethnobot Ethnomed*. 2006; 2: 47-54.
6. De Feo V. Ethnomedical field study in northern peruvian andes with particular reference to divination practices. *J Ethnopharmacol*. 2003; 85(2-3): 243-256.
7. Griffin WJ. Alkaloids in *Datura*, Section *Brugmansia*. The peach flowered form of *Datura candida* sens. lat. *Planta Med*. 1966; 14: 468-474.
8. Bristol M, Evans W, Lampard J. The alkaloids of the genus *Datura*, Section *Brugmansia*. Part VI. Tree *Datura* drugs (*Datura Candida* cvs.) of the Colombian Sibundoy. *Lloydia*. 1969; 32: 123-130.
9. El Imam YMA, Evans WC. Alkaloids of a *Datura candida* cultivar, *D. aurea* and various hybrids. *Fitoterapia*. 1990; 16(2): 148-152.
10. Randerath, K. *Cromatographie sur couches minces*. Paris: Gauthier – Villars; 1971.
11. Rondina R, Coussio J. Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas. *Revista de Investigación Agropecuaria-INTA*. 1969; 5(22): 351-366.
12. Hoet P, Ríos M. Estudio cuantitativo de los alcaloides totales en *Datura stramonium* del Perú. *Metodología. Bol Soc Quím Perú*. 1980; 46: 113-121.
13. Sarazin C, Goethals G, Séquin J, Barbotin, J-N. Spectral reassignment and structure elucidation of scopolamine free base through two-dimensional NMR techniques. *Magn Reson Chem*. 1991; 29(4) : 291-300.
14. Mulholland GK, Jewett DM, Tooringian SA. Routine synthesis of N-[11C-methyl] scopolamine by phosphite mediated reductive methylation with [11C] formaldehyde. *Appt Radiat Isot*. 1988; 39(5):373-379.

## OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEASAS EXTRACELULARES POR *Pseudomonas sp.* M211 EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA

Luis Alejandro-Paredes<sup>a</sup>, Carol N. Flores-Fernández<sup>a</sup>, Amparo I. Zavaleta<sup>\*a</sup>

### RESUMEN

Las proteasas microbianas representan el grupo más destacado en el mercado mundial de enzimas, ya que tienen diversas aplicaciones industriales. Además, poseen ventajas respecto a las producidas por otras fuentes, tales como ser más estables y ser excretadas al medio de fermentación. El género *Pseudomonas* ha sido reportado como productor de proteasas con potencial industrial. Sin embargo, en la producción intervienen factores como la composición del medio y las condiciones de cultivo, cuya optimización permite reducir costos e incrementar el rendimiento. En este contexto, se determinaron los componentes del medio que influyeron significativamente en la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas sp.* M211 en fermentación sumergida. El estudio de un factor a la vez permitió evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y de iones en la producción. Los valores más altos se obtuvieron usando las fuentes de carbono: glicerol, maltosa, galactosa o glucosa; las de nitrógeno: peptona, extracto de carne, extracto de levadura o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; y las de iones:  $\text{CaCl}_2$  o  $\text{KCl}$ . Estos factores fueron seleccionados para elaborar el diseño experimental Plackett-Burman. Los factores se evaluaron en dos niveles, alto (+1) y bajo (-1), y cinco puntos centrales, para lo cual se realizaron 33 experimentos con una réplica. Del análisis, se determinó que los factores extracto de levadura y peptona influyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) en la producción.

**Palabras clave:** Proteasas extracelulares, *Pseudomonas sp.*, Plackett-Burman, fermentación sumergida.

## OPTIMIZATION OF MEDIUM COMPOSITION FOR EXTRACELLULAR PROTEASES PRODUCTION BY *Pseudomonas sp.* IN SUBMERGED FERMENTATION

### ABSTRACT

Microbial proteases are the most important group in the enzymes world market, because have several industrial applications. Moreover, they have some advantages respect to proteases

<sup>a</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Jr. Puno 1002, Lima 1 Perú. e-mail: azavaletap@unmsm.edu.pe

produced by other sources, such as to have more stability and to be excreted to fermentation medium. The genus *Pseudomonas* has been studied as a protease producer of enzymes with industrial potential. Nevertheless, the production is affected by factors such as medium composition and culture conditions, and their optimization lead to reduce costs and increase yield. In this context, medium components that influenced significantly in production of *Pseudomonas sp.* M211 extracellular proteases in submerged fermentation were determined. In this work, one-factor-at-a-time method was used to assess the effect of different carbon, nitrogen and ions sources in proteases production. The highest level of extracellular proteases was obtained in medium containing carbon sources: glycerol, maltose, galactose or glucose; nitrogen sources: peptone, beef extract, yeast extract or  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; and ions:  $\text{CaCl}_2$  or  $\text{KCl}$ . Further, these factors were selected to elaborate Plackett-Burman experimental design. The factors were tested at two levels, high (+1) and low (-1), five center points and 33 trials in duplicate. As a result of Plackett-Burman design analysis, yeast extract and peptone were identified with statistically significant effects ( $p$  value  $< 0, 05$ ).

**Key words:** Extracellular proteases, *Pseudomonas sp.*, Plackett-Burman, submerged fermentation.

## INTRODUCCIÓN

Las proteasas, principalmente las de origen microbiano, constituyen el grupo más importante de enzimas comerciales, ya que tienen gran variedad de aplicaciones en las industrias: alimentaria, farmacéutica, cosmética, médica, peletera, textil, entre otras. Además, estas enzimas son usadas en la formulación de detergentes y en el manejo de residuos y procesos de biorremediación<sup>1-3</sup>.

Las bacterias presentan mayores ventajas en la producción de proteasas debido a su fácil manipulación a nivel genético y crecimiento rápido en espacios limitados. En este aspecto, especies del género *Bacillus* son las principales productoras de proteasas extracelulares, siendo *Bacillus subtilis* la más usada en los sectores industriales<sup>4</sup>. Sin embargo, *Aeromonas sp.*, *Serratia sp.*, *Enterobacter sp.* y *Pseudomonas sp.* también son productoras de proteasas con potencial biotecnológico<sup>5-7</sup>.

Las especies que conforman el género *Pseudomonas* se caracterizan por presentar gran versatilidad de nichos ecológicos, así como de sustratos. En los últimos años, la búsqueda de nuevas cepas bacterianas aisladas de diversos ambientes es permanente, de igual forma, la optimización de la producción de proteasas para disminuir los costos e incrementar el rendimiento. Así, en cepas de *Pseudomonas* se han descrito proteasas alcalinas termoestables con amplio rango de sustratos, tolerantes a solventes orgánicos, y con altos valores de actividad en amplios rangos de pH y temperatura<sup>1,3</sup>.

Por otro lado, la producción de proteasas extracelulares es influenciada por los componentes del medio de cultivo, tales como las fuentes de carbono, nitrógeno y de iones. Por ejemplo,

se ha descrito la composición de los medios de cultivo para la producción de proteasas por *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y *Pseudomonas aeruginosa*<sup>1,4,8,9</sup>.

El estudio de un factor a la vez y el diseño estadístico Plackett-Burman (PB) permiten determinar los componentes del medio de cultivo que influyen significativamente en la producción. A su vez, el diseño PB analiza la interacción entre los factores estudiados a diferentes niveles<sup>10</sup>. Por este motivo, se estudió la influencia de las fuentes de carbono, nitrógeno y de iones en la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas sp. M211*, asimismo se optimizó su producción mediante el estudio de un factor a la vez y el diseño Plackett-Burman.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Microorganismo

La bacteria M211 fue aislada de muestras de suelos de los aguajales (*Mauritia flexuosa*) de Tambopata en Madre de Dios. Para el aislamiento, las muestras de suelos fueron resuspendidas en NaCl 0,9 %; se hicieron diluciones seriadas en buffer fosfato salino hasta 10<sup>-12</sup>, se sembraron en placas con agar triptosa de soya y se incubaron a 37 °C por 24 h. Las distintas colonias fueron aisladas según sus características morfológicas. Después, las bacterias se sembraron en placas con agar nutritivo suplementado con gelatina, caseína o skim milk (1 % w/v). La actividad proteolítica se observó mediante halos de hidrólisis alrededor de las colonias. El aislado bacteriano con el mayor halo de hidrólisis fue identificado mediante la secuenciación parcial de los genes ribosómicos 16S. Los aislados proteolíticos fueron almacenados con glicerol 20 % a -80 °C, mientras que para su uso rutinario se mantuvieron en agar nutritivo a 4 °C.

### Producción de proteasas

*Pseudomonas sp. M211* se cultivó en medio basal conteniendo en g/L: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5; NaCl 2,5; glucosa 2,5 y extracto de levadura 5,0. El cultivo se incubó a 40 °C por 24 h a 135 rpm, después se centrifugó a 10000 rpm por 15 min. El sobrenadante libre de células fue usado para los ensayos analíticos. Todos los experimentos de producción se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de volumen de trabajo y 10 % de inóculo. La temperatura de producción (40 °C) es diferente a la de aislamiento (37 °C), debido a que en ensayos preliminares (datos no mostrados), se determinó que a 40 °C había una mayor producción de proteasas extracelulares por parte de esta cepa.

### Ensayo de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica se determinó según la metodología descrita por Anson con algunas modificaciones usando caseína como sustrato<sup>11,12</sup>. La reacción enzimática consistió de 0,5 mL de caseína 0,5 % (w/v) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 9 a la cual se le añadió 0,5 mL del sobrenadante libre de células de cada medio de cultivo. La mezcla se incubó por 10 min a 40 °C, luego se adicionó ácido tricloroacético (ATC) al 10 % y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Después; se tomó 0,5 mL del sobrenadante y se mezcló con 0,5 mL de NaOH

1,5 M y 0,5 mL del reactivo de Folin & Ciocalteu 0,5 M. La reacción se incubó a 40 °C por 30 min y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. El blanco de reacción consistió de 0,5 mL de caseína 0,5 % en buffer Tris-HCl 50 mM pH 9, la cual fue incubada por 10 min a 40 °C. Luego se le adicionó ATC al 10 % y 0,5 mL del sobrenadante libre de células de cada medio de cultivo. La mezcla se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Posteriormente, se tomó 0,5 mL del sobrenadante y se mezcló con NaOH y el reactivo de Folin & Ciocalteu siguiendo el mismo procedimiento que el descrito anteriormente para las muestras. La concentración de caseína digerida en el sobrenadante fue determinada a 660 nm mediante una curva de calibración elaborada usando L- tirosina como sustrato y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Finalmente, una unidad (U) fue definida como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de tirosina por min a pH 9 y 40 °C. La actividad específica se expresó en unidades de enzima por miligramo de proteína.

### **Determinación de la concentración de proteínas**

Se utilizó el reactivo de Bradford siguiendo el protocolo para microensayo, usando 20  $\mu$ L del sobrenadante libre de células de cada medio y 180  $\mu$ L del reactivo. El blanco se determinó usando 20  $\mu$ L de agua destilada y la misma cantidad del reactivo usado para las muestras. La absorbancia fue medida a 595 nm y se usó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

### **Estudio de un factor a la vez**

La selección de los factores que ejercen un efecto positivo, de manera independiente, en la producción de proteasas se realizó mediante el estudio de un factor a la vez. Las fuentes de carbono estudiadas fueron: glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, almidón, lactosa, galactosa, glicerol y celobiosa; las de nitrógeno: extracto de carne, extracto de levadura, urea,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ , peptona y proteosa peptona; y las de iones:  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  y  $\text{KCl}$ . En total se analizaron 21 componentes del medio de cultivo de manera independiente. Las concentraciones de las fuentes de carbono, nitrógeno y de iones en el medio basal fueron de 10; 20 y 0,5 g/L, respectivamente.

### **Diseño Plackett - Burman (PB)**

El diseño PB permite determinar los factores que influyen de manera significativa en la producción de proteasas en un sistema multivariable. Para ello, se seleccionaron aquellos que, en el estudio de un factor a la vez, ejercieron un efecto positivo en la producción. Se analizaron 10 factores, entre ellos: glucosa, glicerol, maltosa, galactosa, peptona, extracto de levadura, extracto de carne,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{KCl}$ . Los factores fueron evaluados en dos niveles, alto (+1) y bajo (-1), y cinco puntos centrales (0) (tabla 1). Se realizaron 33 experimentos con una réplica en dos bloques y el orden de los experimentos se hizo de manera aleatoria. Para el análisis se empleó el programa Minitab versión 17.

**Tabla 1.** Factores experimentales evaluados en la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas sp. M211* usando el diseño Plackett-Burman.

Código	Factor	Niveles (g/l)		
		-1	0	+1
$x_1$	Glucosa	1,0	7,0	13,0
$x_2$	Glicerol	1,0	7,0	13,0
$x_3$	Maltosa	1,0	7,0	13,0
$x_4$	Galactosa	1,0	7,0	13,0
$x_5$	Peptona	2,0	10,0	18,0
$x_6$	Extracto de levadura	2,0	10,0	18,0
$x_7$	Extracto de carne	2,0	10,0	18,0
$x_8$	NH <sub>4</sub> Cl	1,0	5,0	9,0
$x_9$	CaCl <sub>2</sub>	0,2	0,5	0,8
$x_{10}$	KCl	0,2	0,5	0,8

El diseño PB se desarrolló de acuerdo al siguiente modelo de primer orden:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i$$

donde Y representa la respuesta (producción de proteasas),  $\beta_0$  es el intercepto del modelo,  $\beta_i$  es el coeficiente lineal,  $x_i$  es el nivel del factor independiente y  $k$  es el número de factores involucrados. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y el promedio de la producción de proteasas para cada ensayo se usó como respuesta. En base al análisis de regresión, se consideraron significativos en la producción de proteasas los factores que mostraron un nivel de confianza > 95 % ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

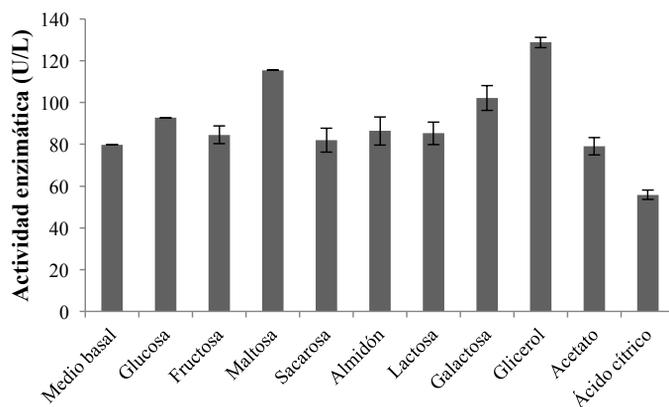
*Pseudomonas sp. M211* fue aislada de muestras de suelos de los aguajales (*Mauritia flexuosa*) de Tambopata en Madre de Dios e identificada mediante el análisis de la secuencia de los genes ribosómicos 16S, presentando un 99 % de similitud con especies del género *Pseudomonas*. Además, esta bacteria presentó halos de hidrólisis de 23,0; 22,2 y 22,3 mm en agares suplementados con gelatina, caseína y skim milk, respectivamente. Los diámetros de los halos de hidrólisis de *Pseudomonas sp M211* fueron superiores a los reportados para otras especies ampliamente conocidas como productores de proteasas comerciales tales como *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, entre otras<sup>4</sup>. De este modo, esta cepa bacteriana fue seleccionada para la producción de proteasas en fermentación sumergida.

La producción de proteasas por parte de los microorganismos es influenciada por un conjunto de factores, entre ellos la composición del medio de cultivo. Asimismo, los requerimientos nutricionales en el proceso de fermentación varían según la especie y la cepa<sup>1,13,14</sup>. Por ello, es importante determinar los componentes que afectan significativamente en la producción de enzimas y otros metabolitos para aumentar el rendimiento.

### Estudio de un factor a la vez

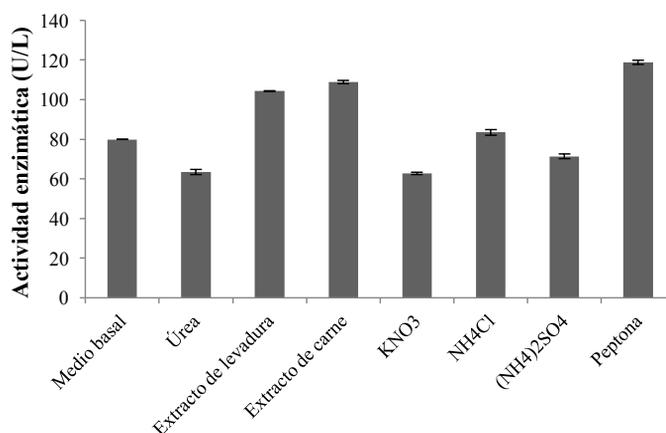
La producción de proteasas por *Pseudomonas sp.* M211 se realizó en fermentación sumergida en un medio basal con el cual se obtuvo 79,84 U/L. Este medio fue suplementado con distintas fuentes de carbono, nitrógeno y de iones, las cuales ejercieron diversos efectos en la producción de proteasas por parte de esta bacteria. La influencia de los factores en la producción de forma independiente permite seleccionar aquellos que ejercen un efecto positivo.

En general, las fuentes de carbono son fundamentales para el crecimiento de los microorganismos y por ende para la producción de sus metabolitos. Es así que, al suplementar el medio basal con estas fuentes, los valores más altos de actividad proteolítica fueron obtenidos usando glicerol, maltosa, galactosa y glucosa. El glicerol y la maltosa incrementaron en 61 % y 45 % la producción de proteasas, respectivamente (figura 1). En un estudio similar, Gupta y col<sup>1</sup>, reportaron que el glicerol fue la fuente de carbono más eficiente para la producción de proteasas en *Pseudomonas aeruginosa* Pse. Con respecto a la glucosa, por un lado, algunos estudios indican que disminuye la producción de proteasas en *Pseudomonas sp.* debido a mecanismos de represión catabólica<sup>1,2</sup>. Por otro lado, se reporta que galactosa, glucosa y maltosa incrementan la producción de proteasas en *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis*<sup>8,9</sup>.



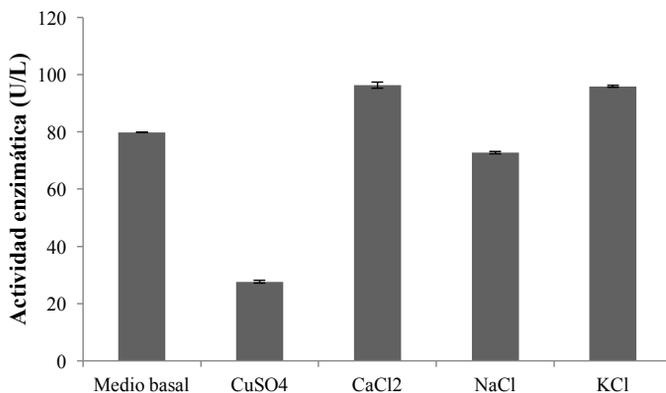
**Figura 1.** Efectos de las fuentes de carbono en la actividad enzimática de las proteasas extracelulares de *Pseudomonas sp.* M211 por estudio de un factor a la vez. Las barras de error indican la desviación estándar.

Los microorganismos metabolizan las fuentes de nitrógeno para obtener aminoácidos y proteínas. En este sentido, se ha descrito que las de naturaleza orgánica son más efectivas para la producción de proteasas, sin embargo su utilización varía de cepa a cepa. En este estudio, la peptona, el extracto de carne y el extracto de levadura incrementaron en 49 %, 36 % y 21 % la producción de proteasas, respectivamente (figura 2). Gupta y col<sup>1</sup>, determinaron en *Pseudomonas aeruginosa* PsA que el extracto de levadura, la peptona y el extracto de carne incrementan en 90 %, 52 % y 10 % la producción de proteasas, respectivamente. A la vez, otros autores reportaron a la peptona como la fuente de nitrógeno más eficiente para la producción de proteasas en *Pseudomonas sp.* y *Bacillus subtilis*<sup>2,4</sup>. Sin embargo, Bhagwat y col<sup>2</sup> indican que el extracto de carne disminuye en 60 % la producción de proteasas en *Pseudomonas sp.* SUK. Por otro lado, el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  incrementó tan solo en 7 % la producción de proteasas en *Pseudomonas sp. M211*. Estos hallazgos están de acuerdo a los reportados por otros autores quienes indicaron que las fuentes orgánicas son mejor utilizadas por cepas de *Pseudomonas sp.* en la producción de proteasas<sup>1,3,13</sup>.



**Figura 2.** Efectos de las fuentes de nitrógeno en la actividad enzimática de las proteasas extracelulares de *Pseudomonas sp. M211* por estudio de un factor a la vez. Las barras de error indican la desviación estándar.

Los iones metálicos estimulan la producción óptima de proteasas así, el  $\text{CaCl}_2$  y el  $\text{KCl}$  incrementaron la producción en un 20 %, mientras que el  $\text{NaCl}$  la disminuyó en 9 % y el  $\text{CuSO}_4$  la inhibió (figura 3). En estudios previos, se reportó que el  $\text{KCl}$  aumenta la producción en un 39 % y el  $\text{CaCl}_2$  estimula la secreción de proteasas en *Pseudomonas sp.*<sup>15</sup>.



**Figura 3.** Efectos de las fuentes de iones en la actividad enzimática de las proteasas extracelulares de *Pseudomonas sp.* M211 por estudio de un factor a la vez. Las barras de error indican la desviación estándar.

### Diseño Plackett-Burman (PB)

Los factores que en el estudio de un factor a la vez ejercieron un efecto positivo en la producción de proteasas por *Pseudomonas sp.* M211, fueron seleccionados para elaborar la matriz del diseño PB. La matriz del diseño experimental con los 10 factores seleccionados ( $x_1$ - $x_{10}$ ) y la respuesta (actividad enzimática) se muestran en la tabla 2. Los valores de actividad enzimática obtenidos experimentalmente (actividad observada) variaron de 173 a 450 U/L, según los niveles de los factores empleados en cada corrida del experimento (tabla 2). Además, podemos notar que estos son cercanos a los calculados (actividad calculada) por el modelo.

**Tabla 2.** Matriz del diseño Plackett-Burman mostrando la actividad de las proteasas extracelulares de *Pseudomonas sp. M211*.

Corrida	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	Actividad enzimática* (U/L)	
											Observada	Calculada
1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	192	233
2	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	263	298
3	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	269	277
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	173	251
5	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	243	310
6	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	291	326
7	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	276	316
8	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	339	313
9	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	256	283
10	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	450	336
11	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	329	293
12	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	377	323
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	409	334
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	361	315
15	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	350	307
16	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	339	335
17	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	339	322
18	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	1	362	331
19	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	277	281
20	-1	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	405	337
21	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	338	315
22	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	254	250
23	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	229	272
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	266	315
25	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	309	335
26	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	1	300	324
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	275	315
28	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	269	299
29	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	297	277
30	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	351	315
31	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	346	315
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	282	323
33	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	248	286

\*Los valores de actividad son el promedio de los duplicados.

El análisis de varianza (ANOVA) del diseño PB presentado en la tabla 3 indica que el extracto de levadura ( $x_6$ ) y la peptona ( $x_5$ ) son los factores que influyen significativamente en la producción de proteasas por *Pseudomonas sp.* M211 ( $p < 0,05$ ). Estos valores coinciden con los reportados por otros autores en estudios similares, quienes describen que de los componentes del medio de fermentación, las fuentes de nitrógeno como el extracto de levadura y la peptona influyen significativamente en la producción de proteasas por cepas de *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*<sup>2,4,10</sup>.

**Tabla 3.** ANOVA de los factores del diseño Plackett-Burman en la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas sp.* M211.

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	p
<b>Modelo</b>	83046	12	6920,5	2,22	*0,024
<b>Glucosa</b>	961	1	961,1	0,31	0,581
<b>Glicerol</b>	114	1	114,3	0,04	0,849
<b>Maltosa</b>	330	1	330,3	0,11	0,746
<b>Galactosa</b>	2138	1	2137,8	0,69	0,411
<b>Peptona</b>	18433	1	18433,1	5,92	*0,018
<b>Extr. levadura</b>	42791	1	42791,1	13,75	*0,001
<b>Extr. carne</b>	1875	1	1874,6	0,60	0,441
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	6174	1	6174,0	1,98	0,165
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	224	1	224,0	0,07	0,790
<b>KCl</b>	8355	1	8354,6	2,68	0,107

\*Valores significativos

La ecuación polinomial de primer orden, mostrada a continuación, explica la producción de proteasas según el análisis de regresión múltiple de los datos:

$$Y=199,7+0,69 x_1+0,24 x_2+0,40 x_3-1,03 x_4+2,27 x_5+3,46 x_6+0,72 x_7+2,62 x_8+6,7 x_9+40,7 x_{10} \text{ ----- (Eq. 1)}$$

De acuerdo a los coeficientes de esta ecuación, se observa que todos los factores ejercen un efecto positivo en la producción de proteasas, excepto la galactosa ( $x_4$ ). Por lo tanto, considerando la significancia de los factores y su efecto en la producción, la ecuación final del modelo sería:

$$Y=199,7+2,27 x_5+3,46 x_6 \text{ ----- (Eq. 2)}$$

En este sentido, el diseño PB permitió determinar que de los 10 factores analizados, sólo dos influyeron significativamente en la producción, lo cual permitió incrementar la producción y reducir el número de factores en estudio.

A partir de la ecuación lineal obtenida del diseño PB (Eq. 2), se podría maximizar la respuesta siguiendo la ruta del ascenso más pronunciada. Esta ruta empezaría desde el punto central del diseño PB; y la variación de los factores  $x_5$  y  $x_6$  estaría en función a los coeficientes de la Eq. 2. El diseño de la ruta del ascenso más pronunciada se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4.** Diseño experimental para la ruta del ascenso más pronunciada en la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas sp. M211*

Pasos	Variables codificadas		Variables naturales	
	$x_5$	$x_6$	Peptona	Extracto de levadura
<b>Origen</b>	0	0	10	10
<b>Paso</b>	0,66	1	1,3	2
<b>Origen + <math>\Delta</math></b>	0,66	1	11,3	12
<b>Origen + 2<math>\Delta</math></b>	1,32	2	12,6	14
<b>Origen + 3<math>\Delta</math></b>	1,98	3	13,9	16
<b>Origen + 4<math>\Delta</math></b>	2,64	4	15,2	18
<b>Origen + 5<math>\Delta</math></b>	3,30	5	16,5	20

Finalmente, se podría pasar al modelo de superficie de respuesta (RSM), un modelo de segundo orden, con el cual se podrían determinar los valores óptimos de  $x_5$  y  $x_6$  en los que Y tenga su valor máximo. El diseño podría ser un diseño de compuesto central (DCC) de 28 experimentos con una réplica, cuya matriz se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5.** Matriz del diseño de compuesto central para la producción de las proteasas extracelulares de *Pseudomonas sp.* M211.

Corrida	$x_5$	$x_6$
1	-1	1
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	1	1
6	-1	-1
7	1	-1
8	1	-1
9	0	0
10	-1	1
11	-1	-1
12	1	1
13	0	0
14	0	0
15	0	-1,4142
16	0	0
17	0	0
18	-1,4142	0
19	0	1,4142
20	1,4142	0
21	0	0
22	0	0
23	0	0
24	0	0
25	-1,4142	0
26	0	1,4142
27	1,4142	0
28	0	-1,4142

## CONCLUSIONES

El estudio de un factor a la vez permitió seleccionar las fuentes de carbono, nitrógeno y de iones que tienen un efecto positivo en la producción de proteasas por *Pseudomonas sp.* M211. Es así que, de los 21 componentes del medio estudiados inicialmente, de manera independiente, se seleccionaron 10 para el diseño Plackett-Burman. Los factores encontrados significativos con este diseño fueron el extracto de levadura y la peptona. Estos resultados indican que las fuentes de nitrógeno influyen de manera significativa en la producción de proteasas por *Pseudomonas sp.* M211.

## AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por CIENCIACTIVA, según Convenio N° 007- FONDECYT-2014.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gupta A, Khare SK. Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Enzyme Microb Technol.* 2007; 42(1):11-16.
2. Bhagwat PK, Jhample SB, Dandge PB. Statistical medium optimization for the production of collagenolytic protease by *Pseudomonas sp.* SUK using response surface methodology. *Microbiology.* 2015; 84(4):520–530.
3. Patil U, Chaudhari A. Optimal production of alkaline protease from solvent-tolerant alkalophilic *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7926. *Indian J Biotechnol.* 2011; 10(3):329–339.
4. Pant G, Prakash A, Pavani JVP, Bera S, Deviram GVNS, Kumar A, et al. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *J Taibah Univ Sci.* 2015; 9 (1):50–55.
5. Divakar K, Priya JDA, Gautam P. Purification and characterization of thermostable organic solvent-stable protease from *Aeromonas veronii* PG01. *J Mol Catal B Enzym.* 2010; 66 (3–4):311–318.
6. Romero FJ, García LA, Salas JA, Díaz M, Quirós LM. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process Biochem.* 2001; 36(6):507–515.
7. Kanchana R, Jadhav S, Goletikar Y, Manerekar G. Production of Alkaliphilic Protease(s) by *Enterobacter sp* for Application in Biodetergent Formulation. *Ind Biotechnol.* 2012; 8(1):31–35.
8. Nadeem M, Qazi JI, Baig S, Syed Q. Effect of medium composition on commercially important alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2. *Food Technol Biotechnol.* 2008; 46(4):388–394.
9. Suganthi C, Mageswari A, Karthikeyan S, Anbalagan M, Sivakumar A, Gothandam KM. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *J Genet Eng Biotechnol.* 2013; 11(1):47–52.
10. Rajendran A, Thirugnanam M, Thangavelu V. Statistical evaluation of medium components by Plackett–Burman experimental design and kinetic modeling of lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. *Indian J Biotechnol.* 2007; 6:469–478.
11. Anson ML. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol.* 1938; 22: 79- 89.
12. Folin O, Ciocalteu V. Enzymatic assay of protease using casein as a substrate. *J Biol Chem.* 1929; 73: 627-650.

13. Reddy LVA, Wee YJ, Yun JS, Ryu HW. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus sp.* RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. *Bioresour Technol.* 2008; 99(7):2242–2249.
14. Boopathy NR, Indhuja D, Srinivasan K, Uthirappan M, Gupta R, Ramudu KN, et al. Statistical medium optimization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 10501, its characterization and application in leather processing. *Indian J Exp Biol.* 2013; 51(4):336–342.
15. Rahman RNZA, Geok LP, Basri M, Salleh AB. An organic solvent-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K. Nutritional factors affecting protease production. *Enzyme Microb Technol.* 2005; 36:749–757.

## PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops brazili*

Luis Ruiz<sup>a</sup>, Dan Vivas-Ruiz<sup>a</sup>, Fanny Lazo<sup>a</sup>, Wolfram Seifert<sup>a</sup>, Edith Rodríguez<sup>a</sup>, Gustavo Sandoval<sup>a</sup>, Armando Yarlequé<sup>a</sup>.

### RESUMEN

Se ha purificado una enzima coagulante del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* denominada enzima similar a trombina (TLE) mediante tres pasos cromatográficos sucesivos sobre Sephadex G-75, DEAE Sephadex A-50 y Sephadex G-50, empleando buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,5. La enzima fue purificada 15,9 veces con un rendimiento del 28,6 % y por PAGE-SDS se obtuvo una sola banda proteica de 48 kDa, tanto en condiciones reductoras como no reductoras usando 2 $\beta$ -Mercaptoetanol. Se trata de una proteína con actividad coagulante, tanto sobre plasma humano citratado como sobre fibrinógeno bovino. La enzima mostró actividad amidolítica sobre el sustrato cromogénico Benzoil-Arginil-p-Nitroanilina (BAPNA) y la potencia coagulante sobre el fibrinógeno bovino fue calculada en 121 unidades NIH de trombina/mg. La enzima fue inhibida por PMSF y por el inhibidor de tripsina de soya, por lo que se trata de una serinoproteasa; el pH óptimo para la actividad amidolítica fue de 8,5 y la proteína fue estable al tratamiento térmico solo hasta los 40 °C. La dosis defibrinogenante mínima fue 8  $\mu$ g/g de ratón y mediante pruebas de inmunodifusión doble se observó inmunorreactividad con respecto al suero antibotrópico polivalente del INS.

**Palabras clave:** *Bothrops brazili*, enzima similar a trombina, veneno, serpiente, coagulación.

## PURIFICATION, BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE THROMBIN-LIKE ENZYME PRESENT IN THE VENOM OF THE SNAKE *Bothrops brazili*

### ABSTRACT

A coagulant enzyme from *Bothrops brazili* snake venom called thrombin-like enzyme was purified by three successive chromatographic steps on Sephadex G-75, DEAE Sephadex A-50 and Sephadex G-50 using 0.05M Tris-HCl buffer pH 8.5. The enzyme was purified 15.9 times with a yield of 28.6% and by PAGE-SDS a single protein band of 48 kDa was obtained both in reducing and non-reducing conditions using 2 $\beta$ -Mercaptoethano., It is a unicateary

<sup>a</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM.

\*luz27@outlook.com.pe

protein with coagulant activity on both citrated human plasma and bovine fibrinogen. The enzyme showed amidolytic activity on the chromogenic substrate Benzoyl-Arginyl-p-Nitroaniline (BAPNA) and the coagulant potency on bovine fibrinogen was calculated on 121 NIH units of thrombin / mg. The enzyme was inhibited by PMSF and the soybean trypsin inhibitor, therefore, it is a serine protease; the optimum pH for the amidolytic activity was 8.5 and the protein was stable to heat treatment only up to 40 °C. The minimal defibrinogenating dose was 8 µg / g of mouse and by double immunodiffusion tests immunoreactivity was observed with respect to INS polyvalent antithrombotic serum.

**Key words:** *Bothrops brazili*, Thrombin-like enzyme, snake, venom, coagulation.

## INTRODUCCIÓN

Los venenos de serpientes son una de las sustancias de mayor complejidad en el mundo animal, en estas se pueden encontrar una diversidad de moléculas orgánicas e inorgánicas que actúan de una manera sinérgica con el objetivo de inmovilizar, matar y digerir a la presa o, en caso alternativo, defenderse de sus depredadores. Los componentes orgánicos, en su mayoría, son de naturaleza proteica y entre estas destacan las serinoproteasas, un grupo particular de enzimas que poseen a un residuo de serina que dirige el ataque nucleofílico en la actividad catalítica.

Las serinoproteasas actúan principalmente a nivel sistema hemostático interfiriendo con los procesos de coagulación (activando o inhibiendo), procesos fibrinolíticos o sobre la agregación de plaquetas. En este grupo de proteasas destacan las enzimas similares a trombina o TLE (del inglés Thrombin-like enzymes) las cuales tienen la capacidad de coagular el fibrinógeno de una manera semejante a la trombina (enzima encargada de la coagulación sanguínea y otros procesos fisiológicos)<sup>1</sup>, no obstante, existen marcadas diferencias estructurales y funcionales entre las TLEs y la trombina, entre las que destacan la insensibilidad de las TLEs ante la heparina, principal inhibidor de la trombina y la no necesidad de iones para activar su catálisis.

Estructuralmente, las TLEs son monoméricas y presentan una triada catalítica compuesta por los residuos His 57, Asp 102 y Ser 195. Además, cuenta con seis puentes disulfuro encargados de la estabilidad, de los cuales cinco de ellos están presentes en todas las serinoproteasas, y el sexto (Cys91-Cys245) es exclusivo de las serinoproteasas de venenos de serpientes<sup>2</sup>.

Las TLEs son estudiadas por su potencial aplicación terapéutica como Reptilasa® y Ancrod de *Bothrops atrox* y *Calloselasma rhodostoma*, respectivamente, ambas empleadas para tratar afecciones cardiovasculares debido a la acción fisiológica coagulante in vivo que ejercen sobre el sistema hemostático.

En el Perú se ha realizado estudios rigurosos sobre esta enzima en los venenos de *B. barnetti*, *B. pictus*, *B. atrox* y *L. muta*<sup>3,4,5,6</sup>. En cuanto a *Bothrops brazili*, peruana, conocida también

como “jergón shushupe”, solo se cuenta con un estudio preliminar de la TLE en su ponzoña, a partir de una purificación parcial y cuya actividad solo ha sido ensayada sobre sustratos cromogénicos<sup>7</sup>, sin embargo, la referencia más reciente con respecto a serinoproteasas de esta especie fue reportada por Zaqueo *et al.*<sup>8</sup>, quienes lograron purificar una de estas enzimas de un espécimen oriundo de Brasil. *B. brazili* es una especie particularmente abundante en la selva norte del Perú abarcando los departamentos de Loreto y Amazonas, frontera con Ecuador, y es una serpiente capaz de inocular hasta 4mL de veneno por mordedura.

La importancia de este estudio estriba en conocer las características más relevantes de esta proteína coagulante y relacionarlas con el grado de toxicidad del veneno, su antigenicidad y la capacidad del antiveneno botrópico comercial para neutralizarla.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Veneno

Se obtuvo veneno de especímenes adultos de *Bothrops brazili* procedentes de la zona del Alto Marañón, departamento de Amazonas, y mantenidos en el Serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural de la UNMSM. Posteriormente fue liofilizado y se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

### Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína fue calculada midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm<sup>9</sup> en un espectrofotómetro Genesys 5. Además, se empleó el método de Lowry<sup>10</sup> modificado en nuestro laboratorio, utilizando un fotocolorímetro Spectronic Bausch & Lomb, empleando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

### Actividad coagulante

Se realizó de acuerdo con el Manual del Instituto Clodomiro Picado<sup>11</sup>, usando como sustratos plasma humano citratado y fibrinógeno bovino comercial (5mg/mL). El plasma humano se obtuvo de donantes voluntarios saludables, para ello se extrajo sangre venosa, la cual fue mezclada con solución de citrato de sodio 3,8 % en relación 9 : 1 y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos para separar el plasma de los paquetes globulares. El fibrinógeno bovino comercial fue preparado a una concentración de 5 mg/mL en buffer Tris HCl 0,05M pH 7,4 a 37 °C. La actividad consistió en preincubar 0,2 mL del sustrato a 37 °C y posteriormente se adicionó 50 µL de enzima purificada y se midió el tiempo de coagulación completa del sustrato. La actividad enzimática se determinó dividiendo la inversa del tiempo de coagulación entre los mg de proteína utilizados.

### Actividad amidolítica

Se determinó empleando el método de Erlanger *et al.*<sup>12</sup>, utilizando el sustrato cromogénico Benzoil-Arginil-p-nitroanilida (BAPNA) midiéndose la liberación de p-Nitroanilina por espectrofotometría. La mezcla de reacción contenía 1,5mL de BAPNA a una concentración de  $9 \times 10^{-4}$  M; 0,5mL de buffer Tris-HCl 0,05M pH 8,1 y 50 µL de la muestra. Luego de

incubar por 15 minutos a 37 °C se adicionó 1mL de ácido acético al 60 % para detener la reacción y cuantificar la p-Nitroanilina por su absorbancia a 405 nm.

### **Purificación de la enzima**

100 mg de veneno de *Bothrops brazili* fueron disueltos en 1 mL de buffer Tris-HCl 0,05M pH 8,5 y aplicados en una columna de filtración molecular Sephadex G-75 (28 x 1,2 cm) previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,5. Se colectaron fracciones de 1mL a un flujo de 10mL/h. Se determinó la cantidad de proteína en cada fracción por absorbancia a 280 nm, el monitoreo de la enzima fue realizado por la actividad amidolítica y las fracciones con mayor actividad fueron juntadas, concentradas y aplicadas a una columna de DEAE Sephadex A-50 (30 cm x 1,5 cm). La enzima eluyó al aplicar el buffer ya mencionado con NaCl 0.3M a un flujo de 16 mL/h y se monitoreó la actividad amidolítica. Las fracciones resultantes con mayor actividad fueron posteriormente recromatografiadas en una columna de Sephadex G-50 (28 x 1,2 cm) con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,5 a un flujo de 9mL/h. Finalmente, luego de evaluar la actividad amidolítica, se juntó y concentró las fracciones de interés para la evaluación del peso molecular.

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

Cantidades equivalentes a 10 µg de la enzima en estudio fueron tratadas con buffer muestra para PAGE-SDS en condiciones reductoras (β-mercaptoetanol) y no reductoras usando una cámara vertical MINI-GEL System (Sigma), siguiendo la metodología de Laemmli<sup>13</sup>. Se realizó la corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 10 % durante a 1h a un voltaje constante de 120 voltios y se emplearon como proteínas patrones de peso molecular: albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

### **Determinación de la potencia coagulante**

Se realizó empleando el método de Baughman<sup>14</sup> usando fibrinógeno bovino comercial como sustrato, para comparar los tiempos de coagulación obtenidos con trombina bovina comercial (100 unidades), veneno total (0,1 mg/mL) y enzima purificada (0,06 mg/mL).

La acción coagulante de la trombina o de la enzima similar trombina se expresa en unidades NIH de trombina/mg de proteína. Se define una unidad como la cantidad de trombina capaz de coagular una muestra de 0,2 mL de plasma o fibrinógeno en un tiempo de 15 segundos a 37 °C.

### **pH óptimo y efecto térmico**

El pH óptimo fue determinado empleando buffer acetato de sodio 0,2 M en un rango de 4,0 a 6,0; buffer fosfato de sodio 0,2 M pH 6,0 - 7,0 y buffer Tris HCl 0,2M pH 8,0 - 10,0. Se midió la actividad sobre BApNA empleando 25µL de la enzima purificada. En cuanto al tratamiento térmico, alícuotas de 30 µL de la enzima fueron sometidas a calentamiento por 15 minutos a temperaturas de 37, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C. Luego fueron enfriados rápidamente, colocándolos en hielo para inmediatamente después, medir la actividad sobre BApNA.

### **Efecto de iones metálicos e inhibidores**

Se prepararon preincubados de la enzima con los iones calcio, magnesio, sodio, potasio y manganeso bajo la forma de cloruros a concentraciones finales de 5 y 10 mM. El mismo tratamiento se empleó para ensayar los agentes: Fenil-metil sulfonil fluoruro (PMSF), Tosil lisil clorometil cetona (TLCK), Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA), iodoacetato e inhibidor de tripsina de soya, registrándose las actividades enzimáticas luego de estos tratamientos.

### **Actividad Defibrin(ogen)ante**

Se determinó siguiendo el protocolo del Manual del Instituto Clodomiro Picado<sup>11</sup>, usando ratones albinos de la cepa Balb c obtenidos del Instituto Nacional de Salud (INS - Perú). La dosis defibrinogenante mínima (DDM) corresponde a la menor cantidad de veneno que produce incoagulabilidad total de la sangre en el lote correspondiente de ratones inyectados.

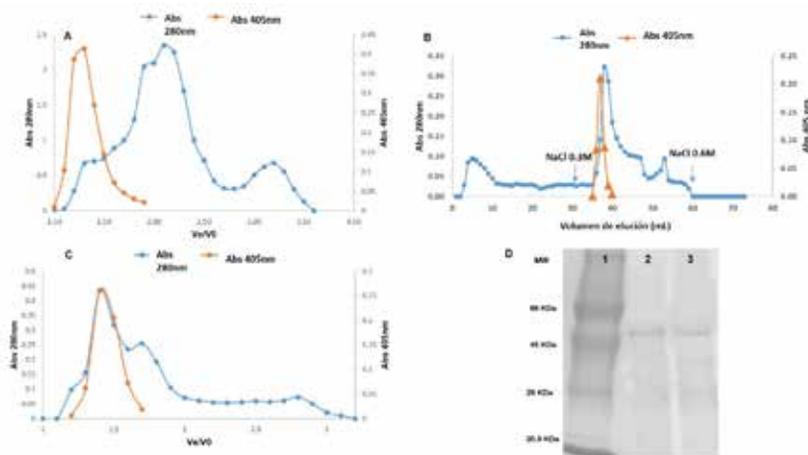
### **Inmunodifusión**

Se evaluó siguiendo el método de Ouchterlony y Nilsson<sup>15</sup>. Para este ensayo se utilizó antiveneno botrópico polivalente (INS-Perú lote 1000376). Para el revelado se empleó azul brillante de Coomassie al 0,1 % y solución decolorante para evidenciar las líneas de precipitación.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Purificación y peso molecular de la enzima**

En la figura 1 se resumen los pasos de purificación de la enzima similar a trombina del veneno de la serpiente *B. brazili*, nuestro procedimiento finalizó con la obtención de la proteína al estado homogéneo con un factor de purificación de 15,9 veces y un rendimiento de 28,5 % (tabla 1). La proteína mostró un comportamiento básico a pH 8,5 debido a que se ligó a la resina de DEAE y fue necesaria la adición del NaCl para desligarla. Los datos obtenidos reflejan ser más eficaces con respecto a lo reportado previamente por Limán<sup>7</sup>.



**Figura 1.** Purificación de la enzima similar a trombina de *B. brazili*. (A) Primer paso de purificación de la TLE sobre Sephadex G-75. (B) Segundo paso de purificación sobre DEAE Sephadex A-50. (C) Tercer paso purificación sobre Sephadex G-50. (D) Análisis en PAGE-SDS de la enzima purificada en condiciones reductoras (carril 2) y no reductoras (carril 3).

El análisis electroforético, tanto en condiciones reductoras como en no reductoras, mostró que la enzima purificada de *B. brazili* aparece como una banda de 48 kDa calculado mediante la determinación del  $R_f$  (Fig. 1d), valor que se encuentra en el rango reportado para otras TLEs, que va desde los 29 kDa hasta los 67 kDa<sup>1</sup> y que difiere de lo reportado por Zaqueo *et al*<sup>8</sup> para una serinoproteasa aislada de la ponzoña de *B. brazili* de Brasil, donde se tuvo un peso molecular de 36kDa de masa relativa determinada por SDS-PAGE 12,5%. La presencia de una única banda indica que la enzima purificada está compuesta de una sola banda proteica al igual que la mayoría de las TLEs<sup>1</sup>.

### Actividad similar a trombina

El veneno total de *B. brazili* presentó una DCM-P de 18,32  $\mu\text{g}$ ., mientras que para la misma especie Rojas<sup>16</sup> obtuvo una DCM-P de 7,39  $\mu\text{g}$ . Esta variabilidad podría deberse a factores como la edad del ofidio, el hábitat, la dieta alimentaria y la estación en la cual se realizó la colecta del veneno. Casos similares se observan para el veneno total de *Crotalus durissus* y *Lachesis muta*, puesto que sus actividades coagulantes difieren según la zona geográfica<sup>17,18</sup>.

La actividad amidolítica de la enzima sobre BApNA (0,317 U/mg de proteína) resulta menor que las exhibidas por otras enzimas purificadas de venenos de serpientes peruanas como *Lachesis muta* (2,25 U/mg)<sup>6</sup>, *B. barnetti* (1,025 U/mg)<sup>19</sup>, *B. atrox*, (0,874 U/mg)<sup>5</sup> y *B. pictus* (0,635 U/mg)<sup>4</sup>. Sin embargo, y en contraste con lo reportado por Limán<sup>7</sup> (0,074 U/mg), la actividad específica de nuestra enzima purificada fue mucho mayor, debido también al mejor grado de purificación y rendimiento alcanzado con la metodología desarrollada en este estudio.

**Tabla 1.** Cuadro de purificación de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops brazili*.

Muestra	Proteína		Actividad específica (U/mg)	Unidades totales de actividad	Rendimiento (%)	Purificación
	Cantidad (mg)	%				
inicial	100	100	0.02	2	100	1
1er paso Sephadex G-75	8.3	8.3	0.18	1.46	73.0	8.8
2do paso DEAE Sephadex A-50	2.6	2.6	0.19	0.50	25.1	9.7
3er paso Sephadex G-50	1.8	1.8	0.32	0.57	28.5	15.9

### Potencia coagulante

La potencia coagulante calculada para el veneno de *B. brazili* sobre el fibrinógeno bovino fue de 7,1 NIH de trombina/mg, mientras que para la enzima purificada fue de 121 NIH de trombina/mg. La potencia coagulante de las TLEs purificadas están dentro de un rango de 0,03 a 2000 Unidades NIH de trombina/ mg de proteína y dentro del género *Bothrops*, el rango va de 0,7 a 1100 unidades NIH de trombina/mg<sup>19,21</sup>.

### pH óptimo y termoestabilidad

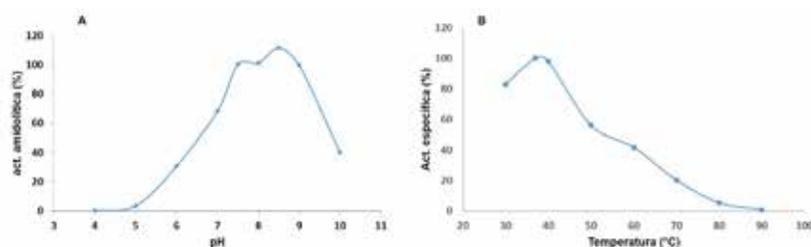
La mayoría de las TLEs son óptimamente activas a pH cercanos a 8,0 y son estables a pH neutros y alcalinos. La enzima aislada en este trabajo demostró tener una actividad por encima del 50 % desde un pH neutro (7,0) a moderadamente alcalino (9,0), con un valor óptimo a pH 8,5 usando BApNA como sustrato. Este mismo valor fue obtenido para TLE de las serpientes peruanas *B. pictus*<sup>4</sup> y *B. barnetti*<sup>19</sup> y se asemeja a lo reportado para *B. brazili* de Brasil<sup>8</sup>.

El pH óptimo varía de acuerdo con la enzima y los diferentes sustratos sobre los cuales ellas actúan. Valores extremos de pH pueden causar desnaturalización proteica considerable y la consecuente inactivación enzimática, por eso es muy útil saber en qué rango de pH la enzima es más estable, ya que el pH de máxima estabilidad no siempre coincide con el de máxima actividad<sup>3</sup>.

La enzima similar a trombina de *B. brazili* mostró una actividad enzimática creciente entre los 37 y 40 °C, manteniendo más del 50 % de su actividad hasta los 50 °C y registrando su acción máxima a 37 °C. Los resultados obtenidos se corroboran con los ya reportados por Limán<sup>7</sup>, donde la enzima de *B. brazili* presenta actividad máxima hasta los 40 °C, pero pierde rápidamente su actividad llegando a tener solamente el 17 % de actividad a los 70 °C. Estos resultados indican que la enzima de esta especie no es muy estable al tratamiento térmico (igualmente señalado por Zaqueo *et al.*<sup>8</sup>), a diferencia de las enzimas que poseen otras especies peruanas, como es el caso de *B. pictus*, cuya actividad amidolítica se mantiene por encima del 50 % hasta los 90 °C<sup>4</sup>. La TLE de *B. barnetti* mostró óptima actividad amidolítica a 40 °C y mantuvo más del 50 % de la misma hasta los 60 °C<sup>19</sup>. En cuanto a la TLE del veneno de *L. muta* peruana presenta actividad en un rango de temperatura desde los 37 °C a los 100 °C, siendo la temperatura óptima para su actividad amidásica de 45 °C<sup>6</sup>.

De las dos propiedades bioquímicas anteriormente analizadas, se puede observar que la estabilidad frente al pH es la más resaltante en la enzima en estudio. Se conoce que la forma en como este estructurada una proteína le va permitir una cierta adaptabilidad a los medios en donde ejerce su acción catalizadora. Un claro ejemplo es el caso de las fosfolipasas A2 de las serpientes, particularmente por los puentes disulfuro que poseen (S-S) y por la termoestabilidad que estos les confieren a esas enzimas, permitiéndoles actuar a temperaturas de hasta 100 °C<sup>19</sup>.

Por otro lado, se ha llegado a establecer que la presencia de carbohidratos asociados a las TLEs les confiere no sólo la capacidad de una estabilidad térmica, sino también la estabilidad en ciertos rangos de pH<sup>3</sup>.



**Figura 2.** A) Determinación del pH óptimo para la actividad amidolítica de la enzima purificada. B) Efecto de la temperatura sobre la enzima purificada, evaluado en su actividad amidolítica.

### Efectos de iones metálicos e inhibidores enzimáticos

En este estudio se observó que la enzima similar a trombina fue inhibida parcialmente por los iones  $Mg^{2+}$  y  $Na^{+}$  a concentraciones de 10 mM (9 y 31 %, respectivamente), mientras que el ión  $Ca^{+2}$  aumentó un 14 % la actividad enzimática a una concentración de 10 mM (tabla 2). El efecto de este último ion difiere de lo reportado previamente por Liman<sup>7</sup>, quien señaló que los iones  $Ca^{2+}$  producían una fuerte inhibición de la actividad de TLE de *B. brazili*. Por otro lado, Vivas *et al.*, demostraron que el ion  $Ca^{2+}$  a 25mM no ejerce efecto alguno sobre la pictobina aislada de la serpiente peruana *B. pictus*.<sup>18</sup>

**Tabla 2.** Efecto de diversos iones metálicos sobre la enzima purificada.

Ion	Concentración	Actividad (%)
control	-	100
Ca <sup>2+</sup>	5 mM	102.7
	10 mM	114.5
K <sup>+</sup>	5 mM	101.8
	10 mM	103
Mg <sup>2+</sup>	5 mM	100
	10 mM	91.4
Mn <sup>2+</sup>	5 mM	102.8
	10 mM	103
Na <sup>+</sup>	5 mM	90.7
	10 mM	69.5

El uso de agentes químicos capaces de causar inhibición y/o modificación en diversos grupos funcionales que poseen las enzimas permitió elucidar detalles estructurales de la proteína en estudio. Se observó que la TLE tuvo una inhibición del 45 % de su actividad con el PMSF, agente que fosforila al grupo hidroxilo del aminoácido serina presente en el sitio activo de las serinoproteasas, el mismo porcentaje de reducción que reporta Vivas<sup>17</sup> para la actividad de la TLE de *B. barnetti* usando la misma concentración de este agente. En relación con lo obtenido, Limán<sup>7</sup> reporta la inhibición del 47 % de actividad enzimática de la TLE de *B. brazili* empleando una concentración de 1mM del agente.

Asimismo, el inhibidor de tripsina de soya (3 mg) inhibió en un 20 % la actividad enzimática, esto debido al acoplamiento que realiza el inhibidor al bolsillo catalítico, región que es semejante en las enzimas de la familia génica tripsina/kalikeina a la cual también pertenece la trombina<sup>21</sup>.

Asimismo, no se detectó inhibición por la adición de EDTA (5mM), Iodoacetato (5mM) y TLCK (5mM) (tabla 3) indicando que la enzima no precisa de iones para su actividad, no posee residuos de cisteína libres y que no usa al residuo de histidina como agente nucleofílico, respectivamente. Estos resultados son semejantes para las TLEs de *B. pictus*<sup>4</sup>, *B. brazili*<sup>7</sup>, *B. barnetti*<sup>19</sup> y *Lachesis muta*<sup>6</sup>.

**Tabla 3.** Acción de inhibidores de proteasas sobre la proteína purificada

Agente	Concentración final	Actividad (%)
Control	-	100
PMSF	5mM	55.02
TLCK	5 mM	101
Inhibidor de tripsina de soya	3mg/mL	80.3
Iodo acetato	5 mM	103.4
EDTA	5mM	99.3

### Dosis coagulante mínima (DCM) y acción defibrin(ogen)ante

La Dosis Coagulante Mínima sobre plasma humano citratado (DCM-P) para el veneno fue de 18,3  $\mu\text{g}$ , en tanto que para la enzima fue de 5,97  $\mu\text{g}$ . Por otro lado, usando fibrinógeno bovino comercial, los valores de la DCM-F fueron 60,3  $\mu\text{g}$  para el veneno y 26,4  $\mu\text{g}$  para la enzima purificada. Otros valores de DCM de TLEs de venenos peruanos nos muestran que la Barnetobina obtenida de *B. barnetti* tuvo una DCM-F de 0,9  $\mu\text{g}$  y una DCM-P de 1,1  $\mu\text{g}$ , y para la Pictobina de *B. pictus* se tuvo valores de DCM-P = 18  $\mu\text{g}$  y DCM-F = 6  $\mu\text{g}$ . En cuanto a la acción defibrin(ogen)ante empleando el modelo murino, se determinó una DDM de 8  $\mu\text{g}$  para la enzima purificada (tabla 4). Este valor resulta más elevado en comparación con los obtenidos para las enzimas purificadas de *B. barnetti* y *B. pictus* (1  $\mu\text{g}$  y 1,2  $\mu\text{g}$ , respectivamente)<sup>3,20</sup>

**Tabla 4.** Cuadro comparativo de la acción similar a trombina de la TLE purificada frente al veneno total.

Muestra	Actividad amidolítica (U/mg)	DCM-P ( $\mu\text{g}$ )	DCM-F ( $\mu\text{g}$ )	DDM ( $\mu\text{g}$ )
Veneno total	0.02	18.32	60.3	n.d.
Enzima purificada	0.32	5.97	26.35	8

### Reactividad antigénica

El veneno de *B. brazili* demostró ser reconocido, mediante inmunodifusión, por el suero antibotrópico polivalente producido por el Instituto Nacional de Salud, lo mismo ocurrió con la enzima purificada, por lo que se puede inferir que esta proteína promueve una respuesta inmune contra su estructura. Se tiene un reporte similar obtenido de la evaluación de la reactividad antigénica de las TLE de *L. muta muta* procedente de Perú y Brasil frente a un suero de origen equino producido por el Instituto Butantán de Brasil<sup>18</sup>.

## CONCLUSIONES

- El veneno de la serpiente *Bothrops brazili* posee una enzima similar a trombina con un peso molecular de 48 kDa.
- La enzima en estudio presenta actividad coagulante sobre plasma humano y sobre fibrinógeno bovino comercial con una potencia coagulante de 121 NIH U/mg de trombina.
- La enzima tiene su mayor actividad en un rango de pH de 7,5 a 9,0 con un pH óptimo de 8,5, y es termolábil.
- La enzima es una serionoproteinasa y no depende de iones metálicos.
- El antiveneno botrópico polivalente producido por el Instituto Nacional de Salud es capaz de reconocer antigénicamente a la enzima purificada.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento del programa FINCyT (ahora Innóvate Perú) Proyecto Contrato N° 131-FINCyT-IB-2013 “Producción de antivenenos específicos contra serpientes peruanas empleando tecnología IgY”. El presente trabajo fue parte de la tesis de Licenciatura en Biología del autor principal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mackessy SP. Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Boca Raton, FL: CRC Press; 2009.
2. Amiconi G, Amoresano A, Boumis G, Brancaccio A, De Cristofaro R, De Pascalis A, et al. A novel venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. *Biochemistry*. 2000; 39: 10294–10308.
3. Vivas-Ruiz D, Sandoval G, Mendoza J, Inga R, Gontijo S, Richardson M, et al. Coagulant thrombin-like enzyme (barnettobin) from *Bothrops barnetti* venom: molecular sequence analysis of its cDNA and biochemical properties. *Biochimie*. 2013; 95(7):1476-86.
4. Mesía M, Lazo F, Yarlequé A. Purificación y caracterización de un nuevo principio coagulante de la serpiente peruana *Bothrops pictus*. *Rev Soc Quim Perú*. 2011; 77(3):182-190.
5. Sandoval G, Ruiz N, Lazo F, Rodríguez E, Yarlequé A, Zingali R. Aislamiento y caracterización parcial de una enzima similar a trombina del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* "jergón". *Rev Soc Quím Perú*. 2010; 76(2): 156-164.
6. Yarlequé A, Campos S, Escobar E, Lazo F, Sánchez N, Hyslop S, et al. Isolation and characterization of fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta*. (Peruvian bushmaster). *Toxicon*. 1989; 27(11): 1189-1197.
7. Limán J. 1996. Purificación y caracterización parcial de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops brazili*. [Tesis para optar al título profesional de biólogo con mención en genética]. Lima: UNMSM; 1996.

8. Zaqueo KD, Kayano AM, Domingos TF, Moura LA, Fuly AL, da Silva SL, et al. BbrzSP-32, the first serine protease isolated from *Bothrops brazili* venom: Purification and characterization. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2016; 195:15-25.
9. Warburg O, Christian W. Isolierung and Kristallisation der Garungs ferments enolase. *Biochem Z*. 1941; 310:384-421.
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1):265-75.
11. Instituto Clodomiro Picado. Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. Manual de Laboratorio. San José: Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica; 2007. P. 21-22.
12. Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 1961; 95: 271-278.
13. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.
14. Baughman DJ. Thrombin assay, In: *Methods in enzymology, proteolytic enzymes*. G.E. Periman & L. Lorand Eds. New York-London: Academic Press. 1970: 145-157.
15. Ouchterlony O, Nilsson L. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Handbook of Experimental immunology*. 1967; I (34): 655- 660.
16. Rojas E, Quesada L, Arce V, Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM. Neutralization of four Peruvian *Bothrops sp.* snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Peru and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta Trop.*, 2005; 93: 85-95.
17. Dos-Santos MC, Assis EB, Moreira T, Pinheiro J, Fortes-Dias C. Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian region. *Toxicon*. 2005; 46: 958-961.
18. Magalhaes A, Ferreira RN, Richardson M, Gontijo S, Yarleque A, Magalhaes HP, et al. Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2003; 136(2), 255-266.
19. Vivas Ruiz D, Inga Arellano R, Mendoza Fernández J, Lazo Manrique F, Yarlequé Chocas A. Barnetobina: Un nuevo principio coagulante purificado del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti*. *Rev Soc Quím Perú*. 2010; 76: 261-270.
20. Vivas-Ruiz D, Sandoval GA, Lazo F, Rodríguez E, Yarlequé A, Flores-Sánchez E. Caracterización de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops pictus* "jergón de costa". *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2015; 32(4): 652-658.
21. Castro HC, Zingali RB, Albuquerque MG, Pujol-Luz M, Rodríguez CR. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61:843-856.

## INFORMACIONES

### SESIÓN SOLEMNE POR EL 84° ANIVERSARIO DE LA FUNDACIÓN DE LA SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

Se realizó el día martes 17 de octubre del presente en el Auditorio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, sede Miraflores.

Se iniciaron las actividades a las 3:00 p.m. con el lanzamiento del CALENDARIO SQP 2018. Luego se dio inicio a la TARDE CIENTÍFICA, cuya coordinación estuvo a cargo de la Dra. Olga Lock, Presidenta de la Sociedad Química del Perú en el periodo 1997-1999.

Se contó con la participación de siete expositores, y se dio a conocer las tendencias de las investigaciones en: Ciencia de los Materiales, con el Dr. Aldo Javier Guzmán Duxtan, UNMSM; Bioquímica, con la Dra. Patricia Herrera Velit, UPCH; Medio Ambiente, con la Dra. María Luisa Castro de Esparza; Corrosión, con la Mag. Isabel Díaz Tang, PUCP; Productos Naturales, con la Dra. Olga Lock, PUCP; Química Verde, con el MSc. Jorge Loayza, UNMSM; e Innovación y Tecnología, con el Ing. Pedro Romero y Otiniano, UNMSM.

A las 7:00 p.m. se dio inicio a la Ceremonia Central. La lectura del Acta de Fundación de la SQP estuvo a cargo del Mag. Helmer Lezama, Secretario General de nuestra Institución, luego se procedió a la develación del retrato del Dr. Mario Ceroni, Presidente de la Sociedad Química del Perú, período 2013-2015. Enseguida se procedió a la premiación del estudiante Andrés Benjamín Fabián Salinas, quien obtuvo una medalla de oro en la edición 49° de la Olimpiada Internacional de Química (Icho) que se desarrolló en la ciudad de Nakhon, en Tailandia. Luego se ofreció un hermoso intermedio musical de cuarteto de cuerdas. Posteriormente, se contó con las palabras del Dr. Juvenal Castromonte Salinas, Jefe de Unidad de Posgrado y Especialización de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y el Discurso de Orden a cargo de la MSc. Graciela Untiveros Bermúdez, Presidenta de la Sociedad Química del Perú y culminó la fecha con el tradicional brindis de honor.

### CONGRESO IBEROAMERICANO DE QUÍMICA: 85 AÑOS DE LA SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ Y XXIX CONGRESO PERUANO DE QUÍMICA

La Sociedad Química del Perú (SQP) organiza el Congreso Iberoamericano de Química y XXIX Congreso Peruano de Química con motivo del 85 aniversario de su creación, eventos que se realizarán del 16 al 19 de octubre del 2018 en la ciudad de Lima, Perú.

Conferencistas\* de diferentes países que a la fecha han confirmado su participación:

**Benzo Moreira, Fabián:** Universidad de la República, Uruguay

**Cea Olivares, Raymundo:** Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México

**Cechinel Filho, Valdir:** Universidad de Itajai (UNIVALI), SC, Brasil

**Chifa, Carlos:** Universidad Nacional del Chaco Austral-UNCAus, Argentina

**García Martínez, Javier:** Universidad de Alicante, Alicante, España

**Giménez Turba, Alberto:** Universidad San Andrés, La Paz, Bolivia  
**Leidinger Ayllón, Walter:** Laboratorios Bayer, Alemania  
**Rivas Quiroz, Bernabé:** Universidad de Concepción, Concepción, Chile  
**Ruiz Pérez, Catalina:** Universidad de La Laguna, Tenerife, España  
**Sauvain, Michel:** Instituto de Investigación para el Desarrollo, Francia - Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú (IRD-UPCH)  
**Tiznado Vásquez, William:** Universidad Andrés Bello, Santiago de Chile, Chile  
**Valdez Gauthier, Carmen:** Florida Southern College, Estados Unidos.  
**Wolfender, Jean Luc:** Universidad de Geneva, Suiza

\*Próximamente se darán a conocer los nombres de otros conferencistas

### SECCIONES TEMÁTICAS

Educación, Historia y Filosofía de la Química, Química como Ciencia Básica, Química para la Vida, Química Verde, Química de los Productos Naturales, Química de los Materiales, Química Ambiental, Ingeniería Química.

### ACTIVIDADES A DESARROLLAR

Conferencias Plenarias, Conferencias Temáticas, Simposios, Mesas Redondas, Cursos, Posters, Charlas Técnicas, QUIMITEC, Concurso La Química y Yo, Festival de Química.

FECHAS IMPORTANTES	
1 de diciembre de 2017 al 31 de mayo 2018	Recepción de los resúmenes de investigación
1 al 15 de junio 2018	Comunicación a los autores sobre la aceptación del resumen enviado
30 de junio 2018	Límite para la inscripción de los autores de los trabajos aceptados

### INVERSIÓN

#### Para Residentes

1- INSCRIPCIONES (Soles)	Hasta el 30 de junio	Después del 30 de junio
Profesionales	420,00	500,00
Socios SQP, *Docentes Universitarios, *Est. Posgrado	320,00	380,00
*Estudiantes Pre-grado	200,00	250,00

\*Deben acreditar su condición

## TARIFAS CORPORATIVAS

- Estudiantes de Pregrado: 10% de descuento sobre el total de la inscripción de 10 alumnos de la misma institución
- Socios, Docentes Universitarios, Estudiantes de Posgrado: 10% de descuento a partir de cinco o más participantes de la misma institución.
- Profesionales: 10% de descuento a partir de cinco o más participantes de la misma institución.

### Para No Residentes

2- INSCRIPCIONES (Dólares)	Hasta el 30 de junio	Después del 30 de junio
Profesionales	200,00	250,00
*Socios de Sociedades Químicas de Países Iberoamericanos	150,00	180,00
*Estudiantes Posgrado	150,00	180,00
*Estudiantes Pre-grado	100,00	140,00
Acompañantes	100,00	

\*Deben acreditar su condición. Se aplican las tarifas corporativas señaladas en parte superior.

### Las inscripciones se iniciarán el 2 de enero 2018

#### INFORMES

Sociedad Química del Perú

Secretaría de la Institución

Lunes a viernes de 10:00 a 13:00 y de 15:30 a 18:30 horas,

Av. Nicolás de Araníbar 696, Santa Beatriz, Lima 01

Teléfono 472 3925, e-mail: [sqperu@gmail.com](mailto:sqperu@gmail.com)

Mayor información en nuestra página web: [www.sqperu.org.pe](http://www.sqperu.org.pe)

### RECONOCIMIENTO A LA DRA. OLGA LOCK

Dentro de las actividades por los 100 Años de la Pontificia Universidad Católica del Perú se llevó a cabo la ceremonia MUJERES 100 PUCP para expresar un reconocimiento a aquellas MUJERES PIONERAS en su actividad en sus aulas, una de ellas fue la Dra. Olga Lock, quien por más de tres décadas perteneció al Departamento Académico de Ciencias y realizó su actividad académica y de investigación en la Facultad de Ciencias e Ingeniería y en la Escuela de Graduados, ocupando además diversos cargos académico-administrativos. La ceremonia se llevó a cabo el día 21 de noviembre del presente. En el año anterior también recibió, del Departamento de Ciencias de la PUCP, un reconocimiento “por ser una de las primeras docentes de la Sección Química dedicada a la investigación y forjadora de nuevos investigadores”.

En la Sociedad Química del Perú la Dra. Lock ocupó la Presidencia en los años 1997-1999, presidió la Comisión Organizadora del XIX Congreso Peruano de Química del año 1995, del XXIV Congreso Latinoamericano de Química y XXI Congreso Peruano de Química en el año 2000, con el auspicio de la Federación Latinoamericana de Asociaciones Químicas (FLAQ), el Congreso Iberoamericano de Química: 75 años de la Sociedad Química del Perú y XXIV Congreso Peruano de Química en el año 2008, realizado en la ciudad de Cusco y, actualmente, está presidiendo la Comisión Organizadora del Congreso Iberoamericano: 85 Años de la Sociedad Química del Perú y XXIX Congreso Peruano de Química a realizarse en la ciudad de Lima del 16 al 19 de octubre del 2018.

**ÍNDICE DE AUTORES**  
**Rev. Soc. Quím. Perú**  
**Vol. 83 - Año 2017**

Aguilar-Gálvez, Ana	200	Esquerre, Cynthia G.	30
Alarcón C., Hugo	420		
Ale B., Neptalí	40	Fernández J., Yadira	30
Alejandro P., Luis	449	Florentini, Alejandro	30
Altamura, D.	3	Flores, Lisveth	403
Álvarez, J.	131	Flores B., C. E.	437
Álvarez T., Daniel	187	Flores F., Carol N.	449
Allcca, Erik	213	Flores L., Omar	282
Angulo C., Jorge R.	341, 348	Flores R., Lennin	371
		Fuertes R., César	265
Benavides, Elena R.	30		
Bendezú, Yéssica	187	García-Godos A., Paula	391
Blas L., H.A.	437	Giannini, C.	3
		Gómez, M. M.	3
Cabanillas A., Billy	442	Guevara P., Américo	308
Cámara, Fernando	16	Gutiérrez M., Luis G.	294
Campos, David	200		
Camus, Juan	249	Hernández, Luz K.	30
Canché E., Gonzalo	65	Herrera A., Venecia	52
Cancino Ch., Keidy	308	Hinostroza Q., Greta	282
Carlos S., Max J.	115	Huamán C., Nils	213
Carranza, Elizabeth	30	Huamán P., Elsa	403
Carrasco F., Cristian	52	Huari S., Piero	383
Carreño, María R.	30	Huiza R., Augusto G.	341
Castro M., Nino	131	Hurtado C., Mario	106
Catacora, Policarpo	16		
Ccapa, Karina	16	Jacinto H., Christian	354
Ceroni G., Mario	341, 348	Juscamayta F., Luis	282
Chávez, Julissa	91		
Chávez P., Jorge	383	Kitazono S., Ana A.	294
Chávez U., Giuliana P.	294		
Chirinos, Rosana	200	Laguna R., José	383
Cortés C., Claudia	52	Lazo, Fanny	463
Corzo L., Alberto	78, 420	Lazo H., Darío	420
Cuadro B., Walter	221	León, Nilton	213
		Lino P., María N.	341, 348
Dávalos, Juan Z.	91	Loayza G. Lillyan	383
Deza M., Elizabeth	160	Lopes, G. H.	437
Días R., Gleny	319	Llontop, Gabriela	308
Encina Z., Christian R.	174	Manrique F., Joaquín J.	160
Ensuncho M., Adolfo	221	Manrique P., Luis	354
Espinoza S., Clara	282		

Manyari C., Galia	282	Samaniego J., Jhonnell	265
Mayta, Roddy	331	Sánchez, César A.	143
Mayta, Jhony	331	Sánchez, Juan I.	91
Medina V., Mari	273	Sandoval, Gustavo	463
Mendoza, Rocío	200	Sandoval C., Patricia	52
Mendoza Ll., Edy	319	Santiago C., Julio	131
Morales G., Juan C.	420	Seifert, Wolfram	463
Moromisato S., Luis E.	294	Siliqi, D.	3
		Silva-Costa T., A. C.	437
Neira V., María G.	65	Solano C., Miguel A.	319
		Solís, J. L.	3
Obregón L., Abner	273	Suárez C., Silvia	40
Osorio A., Ana	160	Suárez S., Luis	187
		Sun K., Rosario	106
Palomino K., Luciano A.	294	Surco L., Felipe	412
Panay, Juan	412		
Pantoja, P. A.	437	Tacuri C., Enrique	65
Pantoja C., Agérico	65	Tipiana, Rocío	412
Paraguay D. F.	3	Tito G., Jesús	78, 234
Peña, Carmen G.	30	Torpoco C., Virginia	442
Pérez S., Tiffany	282	Torres, Ysabel	412
Picasso E., Gino	106	Tovar T., Carlo F.	348
Pomalaya, José	187	Troya S., Jhon	40
Ponce G., Susana	354		
Puca P., Mercedes	65	Urbina G., Juan M.	143
Quispe, Fredy	16	Valderrama N., Ana	91, 115, 354
Quispe S., Miguel	282	Valencia, Zanhy	16
		Valle, Manuel	412
Repo, Ritva	174	Valles R., Silvia	273
Reyna P., Víctor	442	Vicuña P., Denis	403
Robles, Juana R.	221	Vidaurre R., Julio M.	319
Rodríguez, Edith	463	Villanueva H., Claudia C.	341, 348
Rojas B., Daniella S.	174	Visitación F., Lizardo	403
Rodríguez C., Jhanina	391	Vivas- Ruiz., Dan	463
Rodríguez H., Ángel	383		
Rojas, O.	3	Yarlequé, Armand	463
Romero, Violeta L.	91	Yupanqui, Gladys	213
Romero Q., Anthony M.	294		
Rueda, Juan C.	78, 234	Zamorano, Sergio	249
Ruiz, Luis	463	Zavala, Mariana	249
Ruiz S., Anthony	371	Zavaleta, Amparo I.	449

**ÍNDICE DE MATERIAS**  
**Rev. Soc. Quím. Perú**  
**Vol. 83 - Año 2017**

- Aislamiento y elucidación estructural de un compuesto nitrogenado y del haematomato de etilo del líquen *Everniopsis trulla*, por Olivio Nino Castro Mandujano, Julio Santiago Contreras, J. Álvarez. 131
- A mild procedure for the synthesis of allyl and benzyl  $\alpha$ -hydroxyesters using O-allyl(Benzyl)-N, N'-dicyclohexylisourea, por Elvis Robles-Marín, César A. Sánchez, Juan-Manuel Urbina-González. 143
- Asociación de mieloperoxidasa sérica con variables cardiometabólicas en dos poblaciones: Carhuamayo (4100 m – Junín) y Mala (30 m – Lima), por María R. Carreño, Elena R. Benavides, Carmen G. Peña, Alejandro Florentini, Yadira Fernández, Cynthia G. Esquerre, Luz K. Hernández, Elizabeth Carranza. 30
- Capacidad antioxidante *in vitro* y efecto hipoglucemiante de la maca negra (*Lepidium meyenii*) preparada tradicionalmente, por Jhon Troya-Santos, Neptalí Ale Borja, Silvia Suárez-Cunza. 40
- Capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle, por Jhanina Rodríguez Carrasco, Paula García-Godos Alcázar. 391
- Caracterización, mediante espectrometría de masas de alta resolución maldi/FT-1CR, de taninos hidrolizables de la tara (*Caesalpinia spinosa*), por Juan Z. Dávalos, Violeta L. Romero, Juan I. Sánchez, Julissa Chávez, Ana Valderrama-Negrón. 91
- Caracterización química del material particulado atmosférico del centro urbano de Huancayo, Perú, por Luis Suárez-Salas, Daniel Álvarez Tolentino, Yéssica Bendezú, José Pomalaya. 187
- Catalizadores basados en Nix Fe1-x O4 para la deshidrogenación oxidativa del etano a etileno, por Mario Hurtado Cotillo, Gino Picasso, Rosario Sun Kou. 106
- Comparison of the photoprotective effects of sunscreens using spectrophotometric measurements or the survivability of yeast cells exposed to UV radiation, por Luis Gabriel Gutiérrez Mesías, Anthony Mijail Romero Qwisgaard, Giuliana Paola Chávez Untiveros, Luciano Augusto Palomino Kobayashi, Luis Enrique Moromisato Shimabukuro, Ana Akemi Kitazono Sugahara. 294
- Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de semillas de quinua peruana (*Chenopodium quinoa* W.), por Zanhy Valencia, Fernando Cámara, Karina Ccapa, Policarpo Catacora, Fredy Quispe. 16
- Determinación de la máxima retención de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en el néctar de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.), por Daniella S. Rojas Benites, Ritva Repo de Carrasco, Christian R. Encina Zelada. 174

- Determinación y cuantificación de Plumbagina por HPLC-UV extraída de *Dionaea muscipula* E. cultivada *in vitro*, por Jorge Chávez Pérez, Ángel Rodríguez Huamán, Lillyan Loayza Gutiérrez, Piero Huari Soto, José Laguna Runser. 174
- Diseño y caracterización teórica de materiales fotoactivos eficientes basados en derivados de antra[2,3-c]pirrol y antra[2,3-c]tiofeno para celdas solares orgánicas, por Walter Cuadro Bautista, Adolfo Ensuncho Muñoz, Juana R. Robles. 221
- Diseño y formulación de un champú a base de extracto alcohólico de *Urtica urens* L. para su aplicación contra la caída del cabello, por Jhonnell Samaniego Joaquín, César Fuertes Ruitón. 265
- Efecto del sistema de esterilización orgánica (OSS) en las propiedades nutricionales y funcionales del yacón (*Smallantus sonchifolius* Poepp. & Endl.), por Américo Guevara Pérez, Keidy Cancino Chávez, Gabriela Llontop. 308
- Efecto tóxico y ecotoxicológico de arenas negras de la minería artesanal en Madre de Dios, por Elsa Huamán Paredes, Denis Vicuña Puente, Lizardo Visitación Figueroa, Lisveth Flores del Pino. 403
- Efectos de liofilización sobre composición química y capacidad antioxidante en pulpa de cuatro variedades de *Mangifera indica*, por Felipe Surco-Laos, Rocío Tipiana, Ysabel Torres, Manuel Valle, Juan Panay. 412
- Elaboración de nanopartículas de oro en hidrogeles termosensitivos, por Jesús Tito Gutarra, Juan Carlos Rueda, Alberto Corzo. 78
- Estudio químico de las hojas de *Datura candida* (Pers.) Saff, por Billy Cabanillas Amado, Víctor Reyna Pinedo, Virginia Torpoco Carmen. 442
- Evaluación de la estabilidad de carotenoides y actividad antioxidante de la flor de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L.) en la microencapsulación por spray-drying, por Luis Juscamaita Fabián, Tiffany Pérez Salvatierra, Clara Espinoza Silva, Miguel Quispe Solano, Greta Hinostriza Quiñónez, Omar Flores Ramos, Galia Manyari Cervantes. 282
- Evaluación experimental de la degradación fotocatalítica del colorante cibacron navy H-2G empleando nanopartículas industriales de TiO<sub>2</sub>, por Elizabeth Deza Marti, Ana Osorio Anaya, Joaquín J. Manrique Fajardo. 160
- Hidrólisis química y enzimática de extracto de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) para la producción de fructosa, por Rosana Chirinos, Rocío Mendoza, Ana Aguilar-Gálvez, David Campos. 200
- Obtención de una bebida nutritiva a partir de las semillas de sacha inchi *Plukenetia volubilis* L., por Silvia Valles Ramírez, Mari Medina-Vivanco, Abner Obregón-Lujerio. 273

- Optimal conditions for oxidizing phenol in water by fenton and photo-fenton processes, por H.A. Blas López, G.H. Lopes, A.C. Silva Costa Teixeira, C.E. Flores Barreda, P.A. Pantoja. 437
- Optimización del medio para la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas sp.* M211 en fermentación sumergida, por Luis Alejandro-Paredes, Carol N. Flores-Fernández, Amparo I. Zavaleta. 449
- Purificación y caracterización bioquímica de la enzima similar a trombina del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*, por Luis Ruiz, Dan Vivas-Ruiz, Fanny Lazo, Wolfram Seifert, Edith Rodríguez, Gustavo Sandoval, Armando Yarlequé. 463
- Release of anthocyanins from chitosan films cross-linked with sodium tripolyphosphate, por Max J. Carlos-Salazar, Ana C. Valderrama-Negrón. 115
- Remoción de cromo y demanda química de oxígeno de aguas residuales de curtiembre por electrocoagulación, por Roddy Mayta , Jhony Mayta. 331
- Síntesis de 3-nitro-N-(1,1,3-trioxo-1,3-dihidro-2h-1λ6,2-benzotiazol-2-carbotioil)benzamida, por Jorge R. Angulo-Cornejo, Mario Ceroni-Galoso, María N. Lino-Pacheco, Claudia C. Villanueva-Huerta, Carlo Felipe Tovar-Taboada. 348
- Síntesis de bismacromonomero de 2-oxazolina y su posterior polimerización, por Juan Carlos Rueda, Jesús Tito Gutarra. 234
- Síntesis de nanocompuestos poliméricos con grafeno y su caracterización mecánica, por Mercedes Puca Pacheco, Enrique Tacuri Calanchi, Agérico Pantoja Cadillo, María Guadalupe Neira Velázquez, Gonzalo Canché Escamilla. 65
- Síntesis de partículas de MgO y su incorporación en celdas solares sensibilizadas a base de TiO<sub>2</sub>, por O. Rojas, C. Giannini, D. Siliqi, D. Altamura, F. Paraguay-Delgado, J.L. Solís, M.M. Gómez. 3
- Síntesis de sacarinatocobre(I), por Mario Ceroni Galoso, Jorge R. Angulo Cornejo, María N. Lino Pacheco, Claudia C. Villanueva Huerta, Augusto G. Huiza Rojas. 341
- Síntesis y caracterización de películas de (WO<sub>3</sub>)<sub>n</sub> vía sol-gel mediante técnica de recubrimiento por inmersión, por Juan C. Morales Gomero, Alberto Corzo Lucioni, Hugo Alarcón Cavero, Darío Lazo Hoyos. 420
- Transferencia de arsénico en el sistema agua-suelo-maíz de *Zea mays* L., cultivados en la quebrada de Camiña, norte de Chile, por Venecia Herrera Apablaza, Cristian Carrasco Farías, Patricia Sandoval Cárcamo, Claudia Cortés Carvajal. 52

- Uso de edulcorantes comerciales como una alternativa a la reducción de 5-Hidroximetil-2-furfural (HMF) en galletas modelo, por Nils Huamán Castilla, Erik Allcca, Nilton León, Gladys Yupanqui. 213
- Uso del diseño factorial en los ensayos de liberación controlada del ácido 1,3 indolacético cargado en matrices de quitosano, por Ana Valderrama Negrón, Christian Jacinto Hernández, Susana Ponce García, Luis Manrique Pollera. 354
- Variación del contenido de betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante durante el procesamiento de la quinua (*Chenopodium quinoa* W.), por Julio Mauricio Vidaurre-Ruiz, Gleny Días-Rojas, Edy Mendoza-Llamo, Miguel Ángel Solano-Cornejo. 319

#### Enseñanza de la Química

- Estudio espectroscópico RMN bidimensional de bases de Schiff derivadas de la 4-aminoantipirina, por Sergio Zamorano, Juan Camus, Mariana Zavala 249

# **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  
XXIX CONGRESO PERUANO  
LIMA - PERÚ  
Del 16 al 19 de Octubre 2018**