

ISSN impreso: 1810-634X
ISSN on line: 2309-8740

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

**VOLUMEN 86 N° 4
OCTUBRE - DICIEMBRE - 2020**



INSTITUCIÓN CIENTÍFICA FUNDADA EN 1933

LIMA, PERÚ

REVISTA
de la
SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

(Rev Soc Quím Perú)
ISSN impreso: 1810-634X
ISSN on line: 2309-8740

Revista Trimestral

Comité Editor

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

Comité Consultivo

Alarcón Cavero, Hugo
Univ. Nac. de Ingeniería, Perú

La Rosa Toro Gómez, Adolfo
Universidad Nacional de Ingeniería

Areche Medina, Carlos
Universidad de Chile

Morales Bueno, Patricia
Pontificia Universidad Católica del Perú

Cedrón, Juan Carlos
Universidad De la Laguna – España

Ruiz Quiroz, Julio
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Ceroni Galloso, Mario
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Santiago Contreras, Julio
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Flores del Pino, Lisveth
Universidad Nacional Agraria La Molina

Sun Kou, Rosario
Pontificia Universidad Católica del Perú

Gamboa Fuentes, Nadia
Pontificia Universidad Católica del Perú

Valderrama Negrón, Ana
Universidad Nacional de Ingeniería

Hernández Gorriti, Wilfredo
Universidad de Lima

Vega Chacón Juan
Universidad Nacional de Ingeniería

Revista indizada en el Chemical Abstracts, SciELO y Latindex

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

Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú

Teléfono (511) 960 189 928

e-mail: sqperu@gmail.com

Portal web: www.sqperu.org.pe

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

Certificado N° 95-1567

Vol 86

OCTUBRE - DICIEMBRE 2020

N° 4

En el Perú: N° suelto S/.15

Suscripción anual: S/. 60.00

En el extranjero: Suscripción anual: \$50.00

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

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

Comisión de Economía y Finanzas

Presidenta: Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo

Comisión de Publicaciones

Presidenta: Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón

Comisión de Actuaciones Científicas

Presidenta: MSc. Luz Castañeda Pérez

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

CONTENIDO
(Vol. 86 – N° 4 – 2020)

Editorial	339
------------------------	-----

Trabajos Originales

- Actividad antioxidante, polifenoles y flavonoides de <i>Coffea arabica</i> de cinco regiones peruanas, por Silvia Suárez Cunza, Elvi Alfaro Pillihuaman, Emilio Germán Ramírez Roca	343
- Aplicación de las antocianinas obtenidas a partir de <i>Zea mays</i> L. (maíz morado) como agentes inhibidores de la agregación de los péptidos amiloide y tipo amiloide (tripsina agregada), por César A. Zaa, Fernando Retuerto Prieto, Álvaro J. Marcelo.	355
- Capacidad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas de <i>Senecio rufescens</i> DC, por Enrique Javier Aguilar Felices, Pablo Enrique Bonilla Rivera, Edwin Carlos Enciso Roca.	374
- Síntesis y caracterización de nanoestructuras tipo cobre-selenio obtenidas mediante las técnicas de microondas y mecanosíntesis, por Aldo Javier Guzmán Duxtan, Elvis Mauricio Jiménez Peña.	386
- Síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre (NPsCu) por el método Poliol asistido vía microondas (MW), por Aldo Javier Guzmán Duxtan, Joel Claudio Rengifo Maraví, Jezabel Milagros Echevarría Muñoz.	412
- Tratamiento fisicoquímico de los efluentes del proceso de lavado de lana en una industria textil de Arequipa, por María Ofelia Guillén Zevallos, Virginia Pérez Murillo, Tania Quispe Carrizales, María Elena Talavera Núñez, Flora Elsa Huamán Paredes.	428
- Uso de cloro electrogenerado a partir de NaCl en medio ácido como una propuesta para la lixiviación de oro aluvial, por Ulises Quiroz Aguinaga, Angélica María Baena Moncada, Adolfo La Rosa-Toro Gómez.	439

Artículo de enseñanza de la química

- Una aproximación a la tautomería de los heterociclos aromáticos, por José Elguero	452
- Índice de materias	471
- Índice de autores	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) a la Comisión de Publicaciones, junto con una carta dirigida al editor y abonarán 30 soles por concepto de gastos administrativos, como adelanto del pago de la publicación, no reembolsables.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

If the authors reside abroad US \$ 110,00

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

Formato para los artículos

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

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

Editorial

EFFECTOS EN LA PRODUCCIÓN CIENTÍFICA Y AVANCES EN LOS PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN EL PERÚ EN ÉPOCAS DE PANDEMIA

América Latina es una de las regiones más golpeadas por la pandemia de COVID-19, según estimaciones de organismos internacionales como la CEPAL, el Banco Mundial y la OMS. La pandemia sigue generando enormes retos y dificultades, en el Perú y en el mundo, particularmente para América Latina y el Caribe (ALC) a pesar de que varios países siguen tomando medidas y restringiendo algunas actividades para evitar la propagación del virus, los casos siguen aumentando. El COVID-19 sigue generando una alta demanda en diversos suministros médicos, descontrol en los sistemas nacionales de salud pública, devela las carencias de acceder a una atención médica digna, ALC sigue enfrentando diversos problemas no solo en diagnósticos, sino en una incapacidad de respuesta sanitaria para enfrentar de forma oportuna esta pandemia, incluyendo, ahora, una transparencia efectiva en la gestión pública de las vacunas, cuyos efectos en esta crisis son el desempleo, la pobreza y la creciente incertidumbre. Pero, ante este panorama, nos ha mostrado la importancia de la ciencia, tecnología e innovación (CTI) para hacer frente a los retos globales y su papel que ha ejercido en la toma de decisiones políticas durante estos tiempos, donde se ha logrado avanzar hacia el entendimiento del nuevo patógeno en cuestión de meses y es gracias al trabajo colaborativo que profesionales de la salud han estado llevando a cabo. Ahora, más que nunca, las expectativas de la multitud en general se han encaminado a la ciencia con ojos críticos en espera de respuestas llenas de esperanza.

Desde un marco analítico del CTI en los últimos cinco años (2017 a febrero 2021), según Scopus, en el Perú se realizaron 17 334 publicaciones, repartidas al 2017 (17,2 %), 2018 (20,3 %), 2019 (25,6 %), 2020 (32,9 %) y hasta febrero del 2021 (4 %), que conllevaría a un crecimiento de 5 % anual. Las universidades que lideran en este periodo son la Pontificia Universidad Católica del Perú (12,1 %), Universidad Nacional Mayor de San Marcos (11,5 %), Universidad Peruana Cayetano Heredia (11,2 %), Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (7,6 %) y entre otras (57,6 %). En este mismo periodo, solo el 2 % corresponde al área de la química con 435 artículos, distribuidos al 2017 (15 %), 2018 (18 %), 2019 (24 %), 2020 (35 %) y hasta febrero 2021 (8 %). Pero los hechos ocurridos durante el 2020, conllevó a un cambio en las tendencias de investigación, que se evidenciaron sobre los 5 705 documentos publicados en ese año, encabezado por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (11,8 %), Universidad Peruana Cayetano Heredia (10,1 %), Pontificia Universidad Católica del Perú (10,0 %), Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (8,4 %) y entre otras universidades (59,7 %), donde las áreas dominantes, ahora, fueron Medicina (16,7 %), Ingeniería (10,9 %), Ciencias Sociales (10,6 %), Agricultura y Ciencias Biológicas (8,9 %), Ciencias de la Computación (7,9 %), entre otras más ramas. Este efecto del 2020 se evidencia porque involucró prioritariamente los financiamientos recibidos por patrocinadores nacionales como internacionales y, en este contexto, la participación del Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) ocupó el tercer lugar con 157 publicaciones (2,8) y el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) ocupó el cuarto lugar con 112 publicaciones (2 %).

sobre la base de las 5 705 publicaciones del 2020, siendo el 95,3 % correspondiente a otras fuentes de financiamiento. Entonces, basados en la información del CONCYTEC, en Recursos Humanos y Gestión de la Información en CTI sobre la Gestión del Conocimiento en todo el Perú (noviembre 2020) en referencia a la estandarización, sinceramiento de información y mejora de procesos, actualmente existe acceso a literatura científica (IEEE, IOP, SAGE, Taylor & Francis, WILEY, Scopus, EBSCO), se tiene 118 universidades, 9 Escuelas Superiores, 15 institutos gubernamentales y 12 IPIs integradas al repositorio de publicaciones ALICIA, se dispone del convenio con DuraSpace: desarrollo y mantenimiento del software de repositorios institucionales; asimismo, hay una información actualizada de 53 universidades e IPIs sobre gestión de la información en investigación, existe una mejora en el Directorio de RRHH afines a la CTI (ex DINA) e información estadística sobre CTI en el Perú para la Red Iberoamericana e Interamericana de Indicadores de Ciencia y Tecnología (RICYT). Entonces, basados en las estadísticas generales del Repositorio Institucional del CONCYTEC, el número de artículos científicos descargados para el año 2019 (15 917), 2020 (84 131) y hasta febrero del 2021 (20 701), siendo las ciudades con el más alto indicador registrado, Lima (35 845), Arequipa (7 263), Trujillo (4 270) y en el exterior (42 672), en el caso de los países que utilizaron este servicio a nivel mundial fueron Perú (65 483), México (9 804), Estados Unidos de América (8 367), Colombia (5 297), otros países (16 812). Pero en el recuento de artículos depositados fue solo en el 2018 (29), 2019 (103), 2020 (1 747) y en febrero del 2021 (8). Esta misma necesidad ha generado un aumento récord en el volumen de investigaciones realizadas durante esta pandemia, pero está generando cambios significativos en los procesos de publicación científica y exacerbando aún más la brecha de género ya existente en el área de investigación, así como también se debe hablar de los riesgos que implicaría si estas investigaciones no se estuvieran llevando a cabo bajo el más alto rigor de calidad y no solo luchamos contra una epidemia; estamos luchando contra una infodemia, según afirma el director general de la OMS, Tedros Adhanom Ghebreyesus.

En una vista general en el portal de transparencia del gobierno (<http://www.transparencia.gob.pe>), el Presupuesto Institucional Modificado para 2019 del FONDECYT fue de S/ 160 452 240 con un avance de 94,3 %, durante el 2020 fue de S/ 159 479 962, con un avance de 88,1 % y actualmente al 2021, es de S/ 136 174 768 con un avance de 1,2 %. Mientras que para el 2019, al CONCYTEC se le asignó S/ 26 130 047 con un 91,8 % de avance, durante el 2020 fue de S/ 25 012 919, con un 91,3 % de avance y actualmente, al 2021, se le asignó S/ 29 735 713 con un avance de 7,0 %. Haciendo evidente que no existe un marco claro de política económica orientado a mejorar en el desarrollo tecnológico y, según el análisis del gasto público (AGP) en Ciencia, Tecnología e Innovación (CTI), cuyo propósito es determinar la calidad de la combinación de las medidas adoptadas por el Gobierno del Perú para incrementar las oportunidades de impacto que mejoren la competitividad de la economía y que está plasmado en el Estudio de Línea Base del Gasto Público en Ciencia, Tecnología e Innovación en el Perú, (Proyecto CONCYTEC, FONDECYT y el Banco Mundial en marzo del 2020), cuyo soporte está basado en la documentación del Gobierno del Perú, como la Ley Marco de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (Ley 28303), Plan

Nacional de Competitividad y Productividad (Decreto Supremo 237-2019 EF), Ministerio de Economía y Finanzas. Política Nacional de Competitividad y Productividad, Documento Resumen, Consejo Nacional de Competitividad y Formalización, que consolidaron los siguientes resultados y conclusiones: existe una alta concentración del gasto en pocos instrumentos; desbalance en la representación de los objetivos estratégicos del plan nacional de competitividad y productividad; alta concentración del gasto dentro de los sectores de gobierno; alta superposición de objetivos entre instrumentos; alta superposición de objetivos entre sectores de gobierno; alta duplicación de esfuerzos en creación de conocimiento; instrumentos con referencia a múltiples mecanismos de intervención; instrumentos con múltiples tipos de beneficiarios; gran proporción del gasto enfocado a beneficiarios académicos; escasa especialización de instrumentos enfocados al sector privado y perfil académico del sector producción, bajo estas evidencias, con fecha 2 de noviembre del 2020, el Congreso presentó el Proyecto de Ley 06575/2020-CR, mediante el cual se propone la Ley del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación.

Una producción de artículos científicos de esta dimensión no habría sido posible sin recursos que financiaran este proceso extraordinario y no sólo la pandemia ha sido un propulsor en materia de producción, sino también de accesibilidad científica. En este contexto, se debe proponer que las investigaciones y proyectos en CTI no son un gasto, sino una inversión y una gran fortaleza si son usadas para la toma de decisiones de un país, pero se necesita un cambio profundo en las políticas públicas y económicas del mismo, para la mejora del futuro basados en la ciencia, tecnología e innovación.

Prof. Aldo Javier Guzmán Duxtan
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Facultad de Química e Ingeniería Química
aldo.guzman@unmsm.edu.pe

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, POLIFENOLES Y FLAVONOIDES DE *Coffea arabica* de CINCO REGIONES PERUANAS

Silvia Suárez Cunza^a, Elvi Alfaro Pillihuaman^b, Emilio German Ramírez Roca^{*b}

RESUMEN

El café preparado de diversas formas contiene fenoles y flavonoides con actividad antioxidante y con beneficios para la salud. El café peruano cuenta con escasa información sobre sus propiedades antioxidantes. Los objetivos fueron evaluar la capacidad antioxidante total *in vitro*, y el contenido de fenoles totales y flavonoides de cafés procedentes de los valles de Chanchamayo (Junín), Tutumbaro (Ayacucho), Oventeni (Ucayali), Jaén (Cajamarca) y Quillabamba (Cusco). Las muestras se prepararon por infusión al 2 % p/v. Se determinaron sólidos solubles por refractometría y densidad aparente por gravimetría; fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu y flavonoides según Zhishen. La capacidad antioxidante total se evaluó empleando DPPH, ABTS.+ y FRAP, los resultados se expresan como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) y como equivalente a ácido ascórbico (AAEAC). Se encontraron 2,8–3,0 mmol EAG/g de fenoles totales, los flavonoides fueron 135–155 $\mu\text{mol ECq/g}$. Los resultados de TEAC con DPPH estuvieron entre 44–52 mg/g y para AAEAC entre 41–50 mg/g; con el ABTS, la TEAC fue de 55–62 mg/g y AAEAC fue entre 47–52 mg/g; hubo diferencia significativa ($p < 0,05$) para el DPPH y ABTS entre Junín y Cusco. En el FRAP, estuvieron entre 493 y 540 $\mu\text{mol EqFeSO}_4/\text{g}$. No hubo diferencias significativas. Se concluye que los extractos acuosos de los granos tostados y molidos de *Coffea arabica* procedentes de los cinco valles poseen efecto antioxidante *in vitro* en asociación con el contenido de fenoles totales y flavonoides, la diferencia en capacidad antioxidante no es relevante. Este comportamiento es comparable con resultados reportados en la literatura internacional.

Palabras clave: *Coffea arabica*, café, antioxidantes, polifenoles, flavonoides.

^a Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Medicina, UNMSM – Lima. Avenida Grau 755, Lima Cercado, Lima 01.

^b Escuela de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud, UNSCH – Ayacucho. Av. Independencia s/n. Cuidad Universitaria. Ayacucho. *E-mail: Emilio.ramirez@unsch.edu.pe

ANTIOXIDANT ACTIVITY, POLYPHENOLS AND FLAVONOIDS OF *Coffea arabica* FROM FIVE PERUVIAN REGIONS

ABSTRACT

Coffee prepared in various ways contains phenols and flavonoids with antioxidant activity and health benefits. Peruvian coffee has little information on its antioxidant properties. The objectives were to evaluate the total antioxidant capacity *in vitro* and the content of total phenols and flavonoids; then compare the coffees from the valleys of Chanchamayo (Junín), Tutumbaro (Ayacucho), Oventeni (Ucayali), Jaén (Cajamarca) and Quillabamba (Cusco). Samples were prepared by 2% w/v infusion. Soluble solids were determined by refractometry and apparent density by gravimetry; total phenols with the Folin-Ciocalteu reagent and flavonoids according to Zhishen. The total antioxidant capacity was evaluated using DPPH, ABTS. + and FRAP, the results are expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and as Ascorbic Acid equivalent antioxidant capacity (AAEAC). Total phenol results were 2.8–3.0 mmol GAE/g, flavonoids were 135–155 $\mu\text{mol ChE/g}$. The results of TEAC with DPPH were between 44–52 mg/g and between 41–50 mg/g for AAEAC; with ABTS between 55–62 mg TEAC/g and between 47–52 mg AAEAC/g; There was a significant difference ($p < 0.05$) for the DPPH and ABTS between Junín and Cusco. In the FRAP, between 493 and 540 $\mu\text{mol EqFeSO}_4/\text{g}$. There were no significant differences. It is concluded that the aqueous extracts of the roasted and ground grains of *Coffea arabica* from the five valleys have an antioxidant effect *in vitro* in association with the content of total phenols and flavonoids, the difference in antioxidant capacity is not relevant. This behavior is comparable with results reported in the international literature.

Key words: *Coffea arabica*, coffee, antioxidants, polyphenols, flavonoids.

INTRODUCCIÓN

El consumo de café parece, en general, seguro dentro de los niveles habituales de consumo. Preparado de diversas formas contiene compuestos bioactivos no enzimáticos con capacidad antioxidante, reconocido además por sus beneficios para la salud¹. El contenido de los compuestos bioactivos no enzimáticos incluye el alcaloide cafeína, además de ácidos fenólicos, principalmente los ácidos clorogénico, elágico y cafeico; también están presentes flavonoides; variando el contenido de estos componentes entre especies y lugar de origen, proporcionándole al café la calidad de alimento funcional y nutracéutico. Debido a la variedad de compuestos bioactivos no enzimáticos, actualmente se conoce que este producto agroalimentario posee una serie de propiedades como actividad antioxidante, anticarcinogénico y antimutagénica².

La composición, así como sus propiedades fisicoquímicas y organolépticas dependen de diversos factores, los edáficos, la altura, las condiciones climáticas, la radiación solar y otros.

El territorio nacional tiene tal diversidad de condiciones que favorecen la producción del café de modo tal que el 64 % de las regiones producen este recurso vegetal³. El café producido hasta su preparación, como bebida, sufre modificaciones en composición y propiedades con el tratamiento y procesamiento poscosecha, las propiedades antioxidantes, por lo tanto, pueden variar sin que ello signifique necesariamente pérdida, porque eventualmente puede aumentar por la formación de otros compuestos con actividad antioxidante, como los productos de Maillard⁴.

En el Perú, el café se cultiva a altitudes desde los 600 hasta los 1 800 metros, el 75 % de las zonas de cultivo se encuentran por encima de los 1 000 metros sobre el nivel del mar⁵. El Perú es reconocido como un país cafetalero en términos de calidad; sin embargo, los estudios sobre el café cultivado en el Perú están orientados principalmente a los aspectos de cultivo, de procesamiento y calidad organoléptica⁶; siendo escasos los estudios sobre las propiedades funcionales de sus compuestos bioactivos no enzimáticos. El estudio de las propiedades antioxidantes *in vitro*, de diversas variedades de café que se cultivan en el territorio nacional, es importante para su valoración, más allá de las propiedades fisicoquímicas y sensoriales.

La importancia de estas propiedades fueron la base de los objetivos del presente estudio, la evaluación de las propiedades antioxidantes y la comparación de estas propiedades de los granos de café tostados provenientes de cinco regiones del país, con el fin de hallar un denominador común en su comportamiento, que pueda contribuir a una mejor valoración en su biocomercio. Adicionalmente, la información generada permite una comparación con otros estudios en granos de café a nivel internacional.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de las muestras

Se obtuvo un kilogramo de semilla con cáscara de café orgánico de la especie *Coffea arabica* provenientes de los valles Tutumbaro (Ayacucho, temperatura media anual 24,4°C, altitud 1760 m), Chanchamayo (Junín, temperatura media anual 24,6°C, altitud 700 m), Oventeni (Ucayali, temperatura media anual 26,1°C, altitud 1336 m), Jaén (Cajamarca, temperatura media anual 24,5°C, altitud 729 m) y Quillabamba (Cusco, temperatura media anual 23,6°C, altitud 1047 m) del Perú, en temporada de cosecha en el mes de marzo de 2018. En todos los casos se realizó un muestreo por conveniencia.

Diseño metodológico

El tipo de estudio fue cuantitativo mediante un diseño observacional analítico que incluye comparaciones de los granos de diversa procedencia y asociaciones de los parámetros evaluados. El análisis de los resultados se realizó aplicando ANOVA y como prueba de pares poshoc, Tukey, se consideró significativo para un valor $p < 0,05$. La asociación se analizó mediante la correlación de Pearson. Se empleó el programa EXCEL 2016.

Preparación de las muestras y los extractos acuosos

Las semillas fueron lavadas secuencialmente con agua destilada, luego con una solución de hipoclorito de sodio al 0,1 %, se dejó por 5 minutos y finalmente con agua bidestilada. Se dejó secar a temperatura ambiente por una hora; a continuación, se realizó la separación de la cáscara. Los granos pelados fueron sometidos a tostación en una máquina tostadora de café de acero inoxidable a una temperatura de 200 – 220°C durante 8 – 12 minutos, posteriormente se procedió a reducir su tamaño en un molino de café, igualmente de acero inoxidable. Los granos tostados y molidos fueron desecados en la estufa a 37°C durante 24 horas, se uniformizó la humedad en un rango de 11 – 12,5 %. El producto de este proceso se usó para la preparación de los extractos acuosos. Se prepararon extractos al 2,0 % con agua bidestilada a 80 °C y agitación por 30 minutos, se procedió a filtrar. El filtrado se usó para los análisis de antioxidantes y cuantificación de fenoles totales y flavonoides.

Determinación de propiedades físicas

Se evaluó densidad aparente, masa seca y sólidos solubles. La densidad aparente se determinó por gravimetría, se midió 1 mL del extracto y se determinó el peso en una balanza analítica de sensibilidad 0,0001 g. Se llevó a sequedad en una estufa hasta peso constante y la diferencia de pesos correspondió a la masa seca. Los sólidos solubles se midieron en un refractómetro digital, de sensibilidad 0,01 brix con termómetro incluido. Todos los análisis se realizaron por triplicado de muestras independientes a una temperatura de 25°C.

Determinación de compuestos bioactivos no enzimáticos: polifenoles y flavonoides

Contenido de polifenoles. Fueron cuantificados con el reactivo Folin Ciocalteu⁷. El tubo de reacción de un mililitro contenía 0,1 ml de muestra o estándar, se le añadió 0,5 mL del reactivo Folin Ciocalteu diluido 1:10 y una solución de Na₂CO₃ al 7,5 %. Después de 30 minutos se leyó a 765 nm. Se preparó tubo blanco de reactivos. El estándar fue ácido gálico de 20 µg/mL. Se realizaron tres repeticiones y los resultados se expresan en mmol EAG/g.

Contenido de flavonoides (CF). La cuantificación de los flavonoides se realizó con la técnica de Zhishen *et al*⁸. Basado en la propiedad complejante de los flavonoides frente el aluminio (2,5 %) en presencia de NaNO₂ (5 %) en medio alcalino (NaOH 1 M). La absorbancia se leyó a 510 nm. La curva de catequina se preparó de 50-250 µM. El tubo de reacción contenía 0,5 mL de la muestra de extracto o el patrón de catequina, 150 µL de nitrito de sodio, después de 5 minutos, se agregó 250 µL de cloruro de aluminio, reposo por 6 minutos y finalmente 250 µL de NaOH, después de 10 minutos se leyeron. Se preparó un blanco de reactivo y un blanco de muestra. Se realizaron tres repeticiones y los resultados se expresan como equivalentes de catequina (µmol ECq/g).

Medición de la Capacidad Antioxidante Total (CAT)

La CAT se midió con el radical ABTS.+ con la técnica de Re *et al*⁹. El radical se preparó a partir del compuesto ABTS [ácido 7-azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] 7 mM en reacción con persulfato de potasio 2,45 mM, durante 16 h alejado de la luz. La presencia del antioxidante reduce la absorbancia inicial de 0,7 + 0,02 medido a 734 nm. Se preparó tubos de control, blanco y muestra; los tubos tenían un volumen final de 1,0

mL y la muestra de extracto fue de 20 μ L. Se realizaron tres repeticiones y las lecturas se realizaron después de 7 minutos de reacción en un ambiente alejado de la luz. Los resultados se expresan como capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC-ABTS) y capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico (AAEAC-ABTS). La curva de calibración de Trolox fue de 0,5 a 2,5 μ g/mL y la del ácido ascórbico de 1,0 a 4,0 μ g/mL.

CAT con el radical libre DPPH. El radical libre difenil picril hidrazilo (DPPH) de color púrpura fue preparado en etanol grado analítico para una lectura inicial de $0,6 + 0,02$ medido a 517 nm (Joyeux et al)¹⁰. Se prepararon tubos de control, blanco y muestra; los tubos tenían un volumen final de 1,2 mL y la muestra de extracto fue de 0,4 mL, se dejaron reaccionar alejados de la luz y después de 30 minutos se midió la absorbancia. Los resultados se expresan como capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC-DPPH) y capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico (AAEAC-DPPH). La curva de calibración de Trolox fue de 0,5 a 2,5 μ g/mL y la del ácido ascórbico de 1,0 a 4,0 μ g/mL.

CAT medido como el potencial antioxidante de reducción de Fe^{+3} (FRAP). Se evaluó según la metodología de Benzie *et al*¹¹. La molécula 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) actúa como un ligando altamente estabilizador de Fe^{+2} ante la presencia de un antioxidante que reduce el ion Fe^{+3} , en tampón acetato 300 mM, pH 3,6. La reacción se midió por el aumento de la absorbancia a la longitud de onda de 593 nm. El tubo contenía 50 μ L del extracto acuoso de la muestra y 950 μ L de la mezcla buffer acetato: TPTZ: hierro férrico (10:1:1); se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se usó una solución de sulfato ferroso como referencia de 100 - 750 μ M.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características físicas

Las cinco muestras de *Coffea arabica* obtenidas de cinco regiones que geográficamente se ubican en la zona nororiente (Cajamarca), en la zona selva central (Ucayali y Junín), en la zona central sur (Ayacucho) y suroriente (Cusco), tienen en común la temperatura media anual que va desde 23,6 °C a 26,1 °C, con un promedio de 24,6°C, aunque la altitud es variada y va desde 700 m.s.n.m. hasta 1760 m.s.n.m.

Los resultados de los sólidos solubles y la densidad aparente son homogéneos y no presentan diferencias significativas (tabla 1). Los valores obtenidos expresan que las cinco muestras contienen sustancias cuantitativamente muy cercanas.

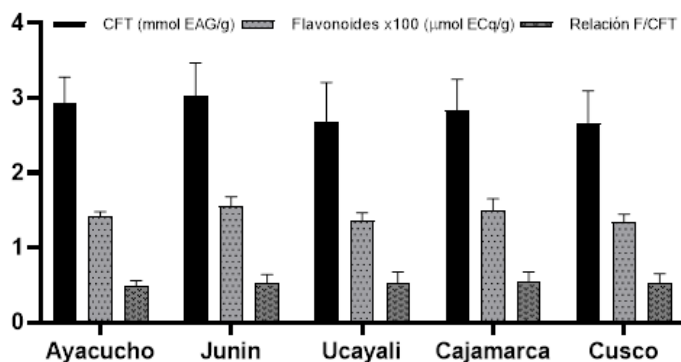
Tabla 1. Propiedades físicas de los extractos de *Coffea arabica* procedente de cinco regiones del Perú.

	Sólidos solubles	Densidad aparente
	grados Brix (% p/p)	g/mL
Ayacucho	0,50	1,009
Junín	0,53	1,017
Ucayali	0,50	1,016
Cajamarca	0,53	1,017
Cusco	0,50	1,014

Con estos datos, y considerando que todas fueron sometidas al mismo procedimiento de secado, tostación y molienda, las propiedades físicas de densidad aparente y sólidos solubles no mostraron diferencias significativas (tabla 1). Los procesos seguidos hasta la obtención de la molienda pueden modificar algunas propiedades físicas, entonces las modificaciones que pudieron haber por efecto de tratamiento no afecto a estas propiedades físicas¹². En este sentido, la temperatura sería uno de los factores ambientales determinantes para la producción homogénea de compuestos bioactivos como los fenoles, flavonoides y probablemente otros metabolitos.

Compuestos bioactivos no enzimáticos

El contenido de fenoles totales (CFT) y flavonoides (F) que se presentan en la figura 1 no muestra diferencias significativas, importante también es notar que este contenido similar se refleja en la relación F/CFT. Estos resultados son similares aun cuando proceden de regiones del norte, centro y sur del país, de altitudes que van desde los 700 m.s.n.m. hasta los 1760 m.s.n.m.

**Figura 1.** Contenido de fenoles totales (CFT) y flavonoides (F) de extractos de café tostado procedentes de cinco regiones. No hubo diferencias significativas.

La ausencia de diferencias significativas en el contenido de fenoles totales (figura 1), refleja que la producción de estos compuestos orgánicos podría ser también consecuencia importante de la temperatura, la que debe ser entre 17°C y 26° C. Otro estudio en café verde y procesado de las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora* tampoco hallaron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales¹³.

El estudio de 34 muestras de cafés comerciales de Panamá, sobre el CFT de las muestras de cafés puros y mezclados estuvo en el rango de 0,17 a 0,28 y 0,07 a 0,10 mmol EAG/g, respectivamente¹⁴. Es decir, que el contenido de polifenoles totales del *Coffea arabica* procedente de los cinco valles de Perú es superior a los comerciales de Panamá, los estudiados estuvieron entre 2,7 y 3,0 mmol EAG/g de café. El factor tiempo de almacenamiento de los cafés comerciales, pudo haber modificado el contenido de fenoles, así se demostró la reducción significativa ($p < 0,01$) en el estudio de almacenamiento durante doce meses a 5°C¹⁵. (Król, Gantner, Tatarak, & Hallmann, 2020). Otro resultado en *Coffea arabica* de Brasil, Colombia, Etiopía e India, mostraron un contenido de fenoles totales de 0,24, 0,22, 0,25 y 0,25 mmol/g de café, respectivamente¹⁶. También hay estudios del contenido de fenoles totales y flavonoides en bebidas de café preparadas de diversas formas. Se mostró que el preparado como “expreso” tuvo el mayor contenido de fenoles totales, 0,29 mmol EAG/g de café y de flavonoides 379 $\mu\text{mol ECq/g}$ de café y se asoció a una mayor capacidad antioxidante¹⁷.

Los flavonoides mostraron el mismo comportamiento que los fenoles, no hubo diferencias significativas, pero se notó un contenido ligeramente mayor (15 %) en la muestra de Junín (155,0 $\mu\text{mol ECq/g}$) con respecto a Ucayali y Cusco (135 $\mu\text{mol ECq/g}$). El mismo estudio de 34 muestras de café comerciales de Panamá¹⁴, mostró que el contenido de flavonoides fue de 76,3 a 132,0 y 32,2 a 50,0 $\mu\text{mol ECq/g}$, para los puros y mezclados, respectivamente. El análisis de correlación de Pearson, entre estos metabolitos secundarios, demostró una fuerte asociación ($r=0,953$) con un valor significativo $p < 0,05$. (tabla 2) lo que ratifica la homogeneidad de los contenidos.

Capacidad Antioxidante Total

La evaluación de la CAT frente a técnicas empleando radicales libres, *ABTS*⁺ y *DPPH* no dio diferencia significativa entre Ayacucho, Junín, Ucayali y Cajamarca, solo en el caso de la CAT del Cusco tiene un menor valor con diferencia significativa ($p < 0,05$) frente a la muestra de Junín. Esta diferencia se muestra frente a ambos radicales libres y expresados con dos estándares, Trolox y ácido ascórbico (figura 2). La muestra procedente de Junín corresponde a una altitud de 700 m.s.n.m y la de Cusco corresponde a una altitud de 1047 m.s.n.m.

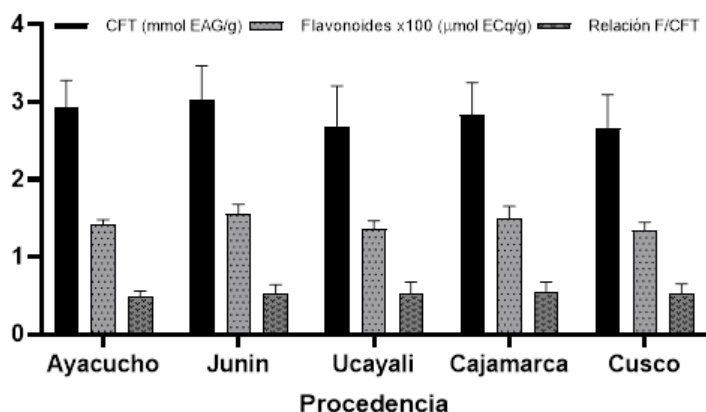


Figura 2. Capacidad antioxidante total (CAT) frente a radicales libres de extractos de café procedentes de cinco regiones del Perú. TEAC: capacidad antioxidante total equivalente a Trolox. AAEAC: capacidad antioxidante total equivalente a ácido ascórbico. *significancia $p < 0,05$.

Estos compuestos bioactivos no enzimáticos son directamente asociados al comportamiento antioxidante y por ende a los beneficios que de ellos derivan. Los extractos sometidos a las pruebas de CAT lo demostraron. En la figura 2 solo se observó diferencia significativa entre la muestra procedente de Junín (TEAC-ABTS: 62 mg/g; TEAC-DPPH: 52 mg/g) frente a la muestra de café procedente de Cusco (TEAC-ABTS: 55 mg/g; TEAC-DPPH: 44 mg/g). Estudios similares fueron hallados por Vega, De León y Reyes (2017), la TEAC-DPPH fue de 28 a 50 mg/g y de 6 a 15 mg/g, para los cafés puros y las mezclas, respectivamente. Ya que temperaturas menores a 17°C o mayores a 26°C afectan la calidad de los granos.

Otro estudio en granos de *Coffea arabica*, como café verde y tostado de diferentes estados de México, mostraron valores de TEAC-ABTS de 47 a 63 mg/g¹⁸, los que se muestran en el presente estudio exhibieron valores de TEAC-ABTS más homogéneos en el rango de 55 a 62 mg/g. Que pueden explicarse por las diferentes condiciones ambientales entre el Perú y México.

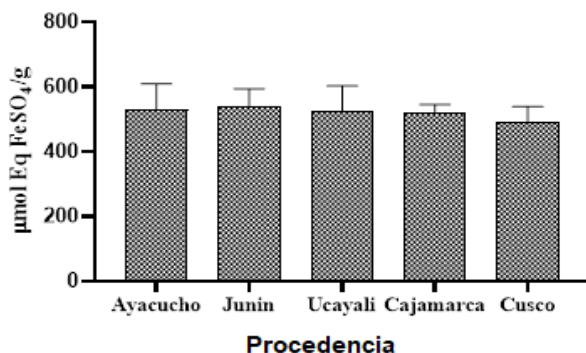


Figura 3. Potencial antioxidante reductor de ion férrico (FRAP) de extractos de café tostado procedente de cinco regiones del Perú. Sin diferencias significativas.

Sin embargo, cuando se ha evaluado el comportamiento por su capacidad antioxidante mediante la reducción del Fe^{+3} (FRAP) no se ha observado ninguna diferencia significativa (figura 3).

Tabla 2. Correlación de Pearson de los parámetros antioxidantes, fenoles y flavonoides de las muestras de café procedentes de las cinco regiones del Perú.

	AAEAC- ABTS	FRAP	TEAC- DPPH	AAEAC- DPPH	CFT	F
TEAC-ABTS	0,951	0,766	0,955	0,955	0,951	0,959
AAEAC-ABTS		0,875	0,999	0,999	1,00	0,999
FRAP			0,873	0,873	0,875	0,688
TEAC-DPPH				1,00	0,999	0,955
AAEAC-DPPH					0,999	0,955
CFT						0,953

CFT: contenido de fenoles totales; F: flavonoides; TEAC: capacidad antioxidante equivalente al Trolox, AAEAC: capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico.

El análisis de correlación para la determinación de la asociación entre el contenido de compuestos bioactivos no enzimáticos y la capacidad antioxidante total mostraron una fuerte correlación ($>0,7$) en toda la evaluación (tabla 2).

El CFT y flavonoides guardan una fuerte correlación con la actividad antioxidante evaluada con las tres técnicas (tabla 2), analizados con la correlación de Pearson¹⁹, especialmente entre CFT frente a las técnicas con radicales libres. Esta fuerte correlación expresa que los fenoles

participan por mecanismos de donación de electrones (SET: *single electron transfer*) y por donación de átomo de hidrógeno (HAT: *hydrogen atom transfer*), así como también como agentes reductores²⁰.

La importancia de los resultados de estas muestras procedentes de las cinco regiones del país radica en saber que, a pesar de las distancias geográficas y la altitud, las muestras de café de las cinco regiones contienen fenoles totales y flavonoides sin diferencia significativa, este contenido está fuertemente asociado a su CAT a través de los mismos mecanismos. Será necesario ahondar los estudios sobre estos mismos parámetros en el grano verde, pues es sabido que el proceso de tostación influye, además de las características organolépticas, en la composición y CAT²¹. Este trabajo constituye un punto de partida para la evaluación del comportamiento antioxidante *in vitro* de las diversas variedades de café cultivados en el territorio nacional, proyectando además estudios sobre la composición y otros ensayos *in vivo*.

CONCLUSIONES

El café peruano exhibe propiedades antioxidantes como las reportadas para esta especie en otros países, y se correlaciona con el contenido de polifenoles y flavonoides. La procedencia de las muestras de *Coffea arabica* de las cinco regiones del Perú, diferentes en ubicación y altitud, no ha determinado una diferencia significativa en el contenido de fenoles totales y flavonoides, ni en la capacidad antioxidante total.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el apoyo parcial de la Facultad de Medicina de la UNMSM en la ejecución del estudio; asimismo, a la Cámara Peruana del Café y el Cacao por las orientaciones recibidas para la obtención de las muestras. También se agradece a la empresa IMSA por las facilidades brindadas para la tostación y molienda. Finalmente, agradecemos al señor Rolando Gamarra, técnico del laboratorio del CIBN, por su trabajo más allá del horario establecido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Poole R, Kennedy OJ, Roderick P, Fallowfield JA, Hayes PC, Parkes J. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *BMJ*. 2017 Nov 22;359: j5024. doi: 10.1136/bmj.j5024
2. Mojica BE, Fong LE, Biju D, Muharram A, Davis IM, Vela KO, Forester SC. The Impact of the Roast Levels of Coffee Extracts on their Potential Anticancer Activities. *J Food Sci*. 2018; 83(4): 1125–1130.

3. Bean C, Nolte GE. Peru Coffee Annual. USDA Foreign Agricultural Services. Global Agricultural Information Network; 2016.
4. Haile M, Kang W. Antioxidant activity, total polyphenol, flavonoid and tannin contents of fermented green coffee beans with selected yeasts. *Fermentation*. 2019; 5(1):29. doi: 10.3390/fermentation5010029.
5. Canet G, Soto C, Ocampo P, Rivgera J, Navarro A, Guatemala G, Villanueva S. La situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe. San José, Costa Rica: IICA; 2016.
6. Ramos E, Lima I, Cornejo G. Comparativo de calidad organoléptica de café (*Coffea arabica* L.) en Puno - Perú y La Paz - Bolivia. *Rev Investig Altoandin*. 2019; 21(2): 283–292.
7. Singleton V, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol*. 1999; 299: 152–178.
8. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 1999; 64: 555–559.
9. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang MA, Rice-Evans C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26(98): 1231–1237.
10. Joyeux M, Mortier F, Fleurentin J. Screening of antiradical, antilipoperoxidant and hepatoprotective effects of nine plant extracts used in Caribbean folk medicine. *Phytother Res*. 1995; 9(3): 228–230.
11. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidan power”: the FRAP assay analytical biochemistry. *Anal Biochem*. 1996; 239: 70–76.
12. Nakilcioğlu-Taş E, Ötleş S. Physical characterization of arabica ground coffee with different roasting degrees. *An Acad Bras Ciênc*. 2019; 91(2). e20180191. doi: 10.1590/0001-3765201920180191
13. Pérez LM, Chávez K, Medina LA, Gámez N. Compuestos fenólicos, melanoidinas y actividad antioxidante de café verde y procesado de las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. *BIOtecnia*. 2013; 15(1): 51. doi:10.18633/bt.v15i1.136
14. Vega A, De León JA, Reyes SM. Determinación del Contenido de Polifenoles Totales, Flavonoides y Actividad Antioxidante de 34 Cafés Comerciales de Panamá. *Inf Tecnol*. 2017; 28(4): 29–38.
15. Król K, Gantner M, Tatarak A, Hallmann E. The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. *Eur Food Res Technol*. 2020; 246(1): 33–39.
16. Dybkowska E, Sadowska A, Rakowska R, Dębowska M, Świdorski F, Świąder K. Assessing polyphenols content and antioxidant activity in coffee beans according to origin and the degree of roasting. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2017; 68(4): 347–353.
17. Ormaza-Zapata AM, Díaz-Arango FO, Rojano BA. The effect of pressure filtration coffee preparation methods (*Coffea arabica* l. var. castillo) on antioxidant content and activity, and beverage acceptance. *DYNA (Colombia)*. 2019; 86(209): 261–270.

18. Lazcano E, Trejo MA, Vargas G, Pascual S. Contenido de Fenoles, Cafeína y Capacidad Antioxidante de granos de café verdes y tostados de diferentes Estados de México. *Rev Iber Tecnología Postcosecha*. 2015; 16(2): 293–298.
19. Ratner B. The correlation coefficient: Its values range between +1/-1, or do they? *J Target Meas Anal Mark*. 2009; 17(2): 139–142.
20. Liang N, Kitts D. Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. *Molecules*. 2014;19(11):19180–19208.
21. Cho AR, Park KW, Kim KM, Kim SY, Han J. Influence of roasting conditions on the antioxidant characteristics of colombian coffee (*Coffea arabica* L.) beans. *J Food Biochem*. 2014; 38(3):271–280.

APLICACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS OBTENIDAS A PARTIR DE *Zea mays* L. (MAÍZ MORADO) COMO AGENTES INHIBIDORES DE LA AGREGACIÓN DE LOS PÉPTIDOS AMILOIDE Y TIPO AMILOIDE (TRIPSINA AGREGADA)

César A. Zaa^a, Fernando Retuerto Prieto^a, Álvaro J. Marcelo^b

RESUMEN

El β -amiloide ($A\beta$) es un péptido tóxico que posee una alta propensión a la agregación, y a menudo se encuentra presente en el cerebro de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA). Los compuestos bioactivos de plantas medicinales con propiedades neuroprotectoras, son agentes de especial interés en la protección contra formas tóxicas del péptido $A\beta$. En el presente trabajo evaluamos la capacidad antiagregante/desagregante de agregados amiloides y derivados amiloides *in vitro* por parte de las antocianinas de *Zea mays* L. (maíz morado). Utilizando el método de pH diferencial, cuantificamos el contenido de antocianinas totales. Con ayuda de las lecturas espectrofotométricas de los complejos proteína tipo amiloide-Rojo Congo y $A\beta$ -Rojo Congo, evaluamos los efectos de antiagregación y desagregación por parte de las antocianinas sobre los péptidos amiloide y derivados amiloide. Los resultados obtenidos evidencian una significativa actividad de capacidad antiagregante y desagregante por parte de las antocianinas (33,54 y 26,63 %, respectivamente), la cual es dependiente de concentración. Además, las concentraciones de antocianinas encontradas de 32,95 y 280,69 mg/L (en medio acuoso y metanólico ácido respectivamente), han sido comparadas con antocianinas y polifenoles de distinta fuente. Los resultados obtenidos son alentadores para continuar evaluando a las antocianinas como potenciales agentes biológicos.

Palabras clave: *Zea mays* L., maíz morado, antocianinas, amiloide, neuroprotección.

^a Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Universitaria s/n., Lima 01, Perú,

* alcesarzl@gmail.com

^b Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal. Jr. Río Chepén 290, El Agustino, Lima 01, Perú.

APPLICATION OF ANTHOCYANINS OBTAINED FROM *Zea mays* L. (PURPLE CORN) AS INHIBITING AGENTS OF AGGREGATION OF AMYLOID AND AMYLOID-TYPE PEPTIDES (AGGREGATED TRYPSIN)

ABSTRACT

β -Amyloid ($A\beta$) is a toxic peptide that has a high propensity for aggregation, and it is often present in the brains of patients with Alzheimer's disease (AD). Bioactive compounds from medicinal plants with neuroprotective properties are of interest in protecting against toxic forms of the $A\beta$ peptide. In the present work, we evaluate the *in vitro* antiaggregant / disaggregating capacity of amyloid and amyloid-type aggregates by the anthocyanins of *Zea mays* L. (purple corn). Using the differential pH method, we quantified the total anthocyanin content. With the help of spectrophotometric readings of the amyloid-like protein-Congo Red and $A\beta$ -Congo Red complexes, we evaluated the antiaggregation and disaggregation effects of anthocyanins on amyloid peptides and amyloid derivatives. The results showed a significant activity of antiaggregant / disaggregating capacity by anthocyanins, (33.54 and 26.63%, respectively) which was dependent on the concentration. In addition, the anthocyanin concentrations found of 32.95 and 280.69 mg / L (in aqueous and acidic methanolic medium, respectively), have been compared with anthocyanins and polyphenols from different sources. The results obtained are encouraging to continue evaluating anthocyanins as potential biological agents.

Key words: *Zea mays* L., purple corn, anthocyanins, amyloid, neuroprotection.

INTRODUCCIÓN

El β -amiloide ($A\beta$) es un péptido de 38 a 42 aminoácidos, siendo el de 42 aminoácidos ($A\beta$ 1-42) el más común, que llega a ser la forma más neurotóxica e hidrofóbica con propensión a la agregación en el hipocampo y las regiones corticales de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA). Los estudios de la cinética de formación de fibrillas de $A\beta$ han demostrado que el tipo $A\beta$ 1-42 forma fibrillas significativamente más rápido que el tipo $A\beta$ 1-40. Además, los tratamientos que reducen los niveles de $A\beta$ 1-42 se correlacionan con una disminución del riesgo de la EA. El péptido $A\beta$ deriva de la escisión proteolítica de una glucoproteína llamada proteína precursora amiloide (PPA). La glicoproteína de membrana tipo 1 PPA juega un papel importante en una variedad de actividades biológicas¹.

Los radicales libres contribuyen a la producción del péptido $A\beta$. Durante este proceso, el $A\beta$ induce el estrés oxidativo asociado a la membrana neuronal, lo que aumenta la vulnerabilidad neuronal a la excitotoxicidad. Al aumentar la concentración de las especies reactivas del oxígeno (EROs), el tipo de fibrillas $A\beta$ puede provocar daños en el ADN nuclear y mitocondrial de las neuronas².

La estructura amiloide está compuesta por láminas beta cruzadas, conformando fibrillas de amiloide las cuales pueden estar asociadas con una serie de enfermedades neurodegenerativas. En estas fibrillas se incluyen a los péptidos A β : dímeros, trímeros, tetrámeros (conocidos colectivamente como oligómeros), ligandos difusibles derivados del A β (o ADDLs) y estructuras similares a un cordón de hasta 200 nm de longitud, llamadas protofibrillas³.

Los primeros estudios realizados sobre fibrillas amiloides mediante difracción de rayos X, revelaron que compartían una huella digital común, una hoja plegada en forma de β -cruzada. Esta evidencia luego se confirmó mediante un estudio de difracción de varias fibrillas amiloides *ex vivo* (evaluación hecha a partir de un tejido, todavía funcional, fuera del organismo) y sintéticas. El patrón de difracción de rayos X dada por las fibrillas amiloides, es " β -cruzada". Dicho patrón indica que estas moléculas fibrosas comparten una estructura central particular consistente de conformación de láminas β , en el cual la dirección de enlace de hidrógeno es paralela al eje de la fibra y las hebras β son perpendiculares, muy parecidas a los peldaños de una escalera. En general, los modelos son de naturaleza β -cruzada y la conformación de la lámina β forma el núcleo de la estructura. Los estudios de fibrillas formadas a partir del A β de longitud completa han demostrado que el péptido se pliega en una estructura de curvatura β que luego se asocia con otras moléculas para formar cadenas paralelas en la conformación de la estructura⁴.

En la figura 1 se muestra el modelo estructural para las fibrillas A β 1–40, consistente con las restricciones (entradas para los programas de generación de estructuras) de su dilucidación por resonancia magnética nuclear (RMN) en estado sólido sobre la conformación molecular y las distancias intermoleculares, e incorporando segmentos cortos de la estructura de una proteína en forma de cruz- β común a todas las fibrillas amiloides¹¹. La unidad β -cruzada es una estructura de doble capa, con 2 láminas β paralelas formadas por los residuos 12-24 (aminoácidos Q15, L17, F19, A21, cintas naranjas) y 30-40 (aminoácidos I31, M35 y V39, cintas azules) las cuales son neutras y principalmente hidrófobas (posiciones no mostradas en la figura). Además, las cadenas laterales de A30, I32, L34, V36 y V40 (Figura 1b) forman una cara hidrófoba.

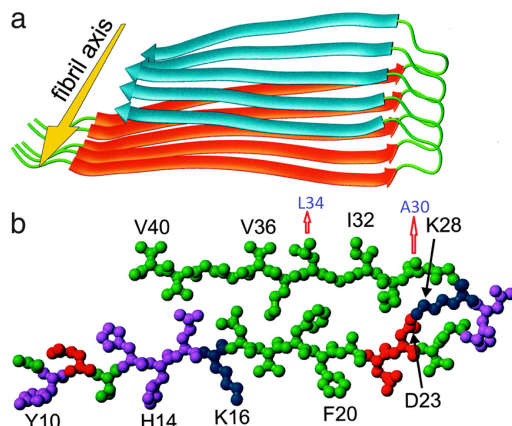


Figura 1. Modelo estructural para las fibrillas Aβ. (a) Representación esquemática de una sola capa molecular, o unidad β-cruzada. La flecha amarilla indica la dirección del eje largo de la fibrilla que coincide con la dirección de los enlaces de hidrógeno del esqueleto intermolecular. (b) Molécula central Aβ1-40 del sistema de cinco cadenas de energía minimizada, vista hacia abajo del eje largo de la fibrilla⁴. Los residuos están codificados por colores según sus cadenas laterales como hidrofóbico (verde), polar (magenta), carga positiva (azul) o carga negativa (rojo).

En la figura 2 se muestra la jerarquía de la estructura del péptido Aβ plegado en una estructura de lámina β plegada desde protofilamentos a fibrillas amiloides⁵.

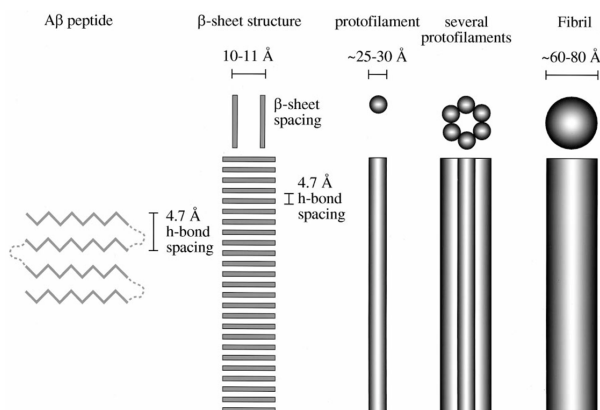


Figura 2. Representación de las fibrillas amiloides sintéticas obtenidas a partir de micrografía electrónica de péptido Aβ que muestra fibrillas largas, rectas y no ramificadas⁵.

La extracción de los compuestos bioactivos (referidos principalmente a los polifenoles) con propiedades neuroprotectoras, a partir de plantas medicinales, es de gran interés debido a que dichos compuestos ejercen una protección contra las formas tóxicas del péptido A β . Por ejemplo, el metil cafeato, un éster fenólico, presente en diferentes plantas que son parte de la dieta humana como la albahaca, salvia, romero, o el té, es capaz de reconocer y unirse a oligómeros A β 1-42, mostrando actividad antiamiloidogénica⁶.

Recientes estudios han informado sobre el potencial de los antioxidantes en la inhibición de la deposición del péptido A β mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los polifenoles del vino, la miricetina, morina, quercetina, kaempferol, (+) –catequina y (-) – epicatequina, inhibieron la formación de las fibrillas A β , así como su extensión⁷.

Varios agentes antioxidantes han demostrado ser neuroprotectores frente a la toxicidad inducida por el A β . La especie *Zea mays* L. es una variedad genética de maíz peruano, que presenta el colorante antocianina, el cual tiene aplicación en la industria farmacéutica y alimentaria. Las personas consumen este colorante principalmente en la bebida conocida como “chicha morada”⁸.

Entre los principales pigmentos del maíz morado se encuentran la cianidina 3,5-di-O-glucósido (C3G), la pelargonidina 3,5-di-O-glucósido, la peonidina así como sus respectivos derivados malonilos. La principal antocianina que se encuentra en mayor proporción en las plantas es la cianidina-3-glucósido, la cual se forma como consecuencia de un pH bajo⁹.

La biosíntesis de la cianidina 3-O-glucósido se demostró mediante ingeniería genética en bacterias *Escherichia coli*. En la conversión de la leucoantocianidina (incolores) a antocianidina 3-glucósido (coloreada) participan al menos dos enzimas, antocianidina sintasa (ANS) y UDP-glucosa: flavonoide 3-O-glucosiltransferasa (3-GT). A pesar de la importancia de esta secuencia en la biosíntesis de las antocianinas, el mecanismo de reacción bioquímica no está definido. Los extractos crudos de *Escherichia coli*, que expresan ANS recombinantes de estas especies de plantas, y enzimas recombinantes purificadas de la petunia y el maíz, catalizaron la formación de antocianidina en presencia de iones ferrosos, 2-oxoglutarato y ascorbato. La formación *in vitro* de cianidina 3-glucósido (compuesto coloreado) a partir de la leucocianidina, se demostró utilizando la ANS de petunia y 3-GT¹⁰.

Se ha estudiado a las antocianinas debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas, además, se ha demostrado que el uso de las antocianinas previene la obesidad, diabetes y enfermedades cardíacas, además, reduce el riesgo de diabetes, así como de trastornos de la función cognitiva¹¹.

Se ha evidenciado que las antocianinas extraídas de la capa de semilla de la soja negra (*Glycine max* L.) tuvieron efecto neuroprotector en un modelo de toxicidad por privación de oxígeno-glucosa y muerte celular inducida por glutamato en neuronas corticales primarias de rata. Este resultado podría estar relacionado a la inhibición del estrés oxidativo y la preservación del potencial de membrana mitocondrial¹².

En base a los antecedentes mencionados, en el presente trabajo se describe la cuantificación de antocianinas totales de *Zea mays* L. (maíz morado) y evaluación de la capacidad antiagregante/desagregante del péptido beta amiloide (A β 1-42) y tipo amiloides (tripsina agregada) en modelos *in vitro* libres de células.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Atomizado de Antocianinas extraídas de *Zea mays* L. (maíz morado), donado gentilmente por Sensient Natural Colors Perú S.A.C (antes Globenatural Colors S.A.C.).

Material químico

Tripsina liofilizada (Sigma-Aldrich), fragmento proteico β -amiloide A β 1-42 (Sigma-Aldrich), Fluoruro de fenilmetilsulfonilo PMSF (Sigma-Aldrich), Rojo Congo, dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck Millipore).

Preparación de las muestras

Los atomizados de antocianinas, altamente hidrofílicas, se disolvieron en agua ultrapura o sistema de buffer y se filtraron en filtros de 0.22 μ m previo a su uso. Las soluciones stocks preparadas se almacenaron en recipientes protegidos de la luz a 4 °C por un tiempo no mayor a 5 días.

Determinación del contenido de antocianinas totales

Absorbancia de pH diferencial

Los atomizados de antocianinas fueron utilizados para preparar soluciones acuosas y metanólicas de antocianinas. En la extracción acuosa se obtuvo una concentración de 1 mg/mL en agua ultrapura. Para la extracción metanólica (acídica, con HCl al 1 %), se obtuvo una concentración de 5 mg/mL. Los extractos se mantuvieron protegidos de la luz y fueron conservados a 4 °C por 24 horas. Luego se filtraron y conservaron a 4 °C hasta su uso.

En el procedimiento se utilizó 2 soluciones tampón: cloruro de potasio (pH=1; 0.025 M) y el acetato de sodio (pH= 4.5; 0.4 M). Se diluyó 0,4 mL de cada extracto con 3,6 mL de cada tampón (2 muestras en tubos de pH= 1 y pH= 4.5).

Las absorbancias se midieron en el lector de microplaca Biotek Synergy a una longitud de onda de 510 y 700 nm, con pH igual a 1 y 4.5, respectivamente. El contenido de antocianinas totales (CAT) se determinó usando el peso molecular y el coeficiente de extinción de la cianidina-3-glucósido (449.2 y 29 600 respectivamente), y se expresó en mg de cianidina-3-glucósido / L, de acuerdo con la siguiente ecuación¹³.

$$\text{CAT (mg/l)} = \frac{\mathbf{A*PM*FD*1000}}{\epsilon *l}$$

Donde:

A: Absorbancia en pH=1 ($\lambda=510 - 700$) y pH=4.5

FD: Factor de dilución (10)

PM: peso molecular de la cianidina-3-glucósido (449.2 g/mol)

ϵ : coeficiente de extinción molar de cianidina-3-glucósido (26,900 L / mol / cm)

l: trayectoria óptica, 1 cm

En el presente trabajo, se realizó una extracción de antocianinas totales y por el método de pH diferencial se expresaron como contenido de cianidina-3-glucósido (compuesto referencial de la principal antocianina en el maíz morado), tanto para las soluciones acuosas como alcohólicas.

Ensayo de anti-agregación de proteína plegada tipo amiloide

Medida de turbidimetría

La estructura amiloide está compuesta por láminas beta cruzadas, conformadas por fibrillas de amiloide, las cuales pueden estar asociadas con una serie de enfermedades. En este trabajo, se evaluó el efecto inhibitorio de la formación de fibrillas tipo amiloides por parte de las antocianinas de *Zea mays* L.

Debido a que la agregación *in vitro* de proteínas solubles a menudo se puede evidenciar en condiciones suaves de desnaturalización, a alta temperatura, a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico o en presencia de disolventes orgánicos polares, en el presente trabajo inducimos la agregación *in vitro* de la tripsina en etanol. Para evaluar la inhibición de la agregación, se indujo a la formación de fibrillas tipo amiloide por parte de la tripsina, mediante la co-incubación con etanol acuoso, debido a que la desnaturalización inducida por el alcohol de la proteína nativa suele ir seguida de la inducción de una estructura de hélice α y una posterior transformación en una conformación de lámina β predominante¹⁴.

Dichas fibrillas de tripsina, inducidas para su agregación en tipo amiloides, fueron inactivadas por el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) para evitar su autólisis, lo cual podría interferir en la formación de las fibrillas.

Se mezcló 50 μL de PMSF (50 mM) con 100 μL de tripsina (50 mg/mL en HCl 0.001N) y luego se adicionó 5 mL de buffer fosfato de potasio (pH = 7). Se agitó la solución con mini-imanés magnéticos por 20 minutos y se dejó en reposo por 1 hora a temperatura ambiente. Se filtró la solución y se completó a 10 mL con buffer fosfato de potasio 0.05 M.

La variación del coeficiente de extinción se controló a una longitud de onda igual a 350 nm usando el lector de microplaca Biotek 880. Para los ensayos se consideró lo siguiente: 1) Control, 100 μL de la tripsina agregada (T); 2) 100 μL tripsina y 90.91 $\mu\text{g/mL}$ de antocianinas (ANT); 3) 100 μL de la tripsina y 130.43 $\mu\text{g/mL}$ ANT; 4) 100 μL de la tripsina y 166.67 $\mu\text{g/}$

mL ANT; 5) 100 μ L de la tripsina y 200 μ g/mL ANT; 6) 100 μ L de la tripsina y 230.77 μ g/mL ANT.

Los cambios en la turbidez se midieron a 24 ° C y a pH igual a 7.0, en etanol al 55% / tampón fosfato 10 mM, a una concentración de proteína de 0.15 mg/mL después de 24 horas de incubación. Los ensayos se llevaron a cabo después de la incubación de las fibrillas tipo amiloide por 10 minutos, con o sin presencia de distintas concentraciones de antocianinas.

Ensayo de unión al Rojo Congo (RC). Inhibición de la agregación

El ensayo de unión del colorante Rojo Congo a las fibrillas tipo amiloides formadas, se realizó por lecturas del espectro de absorción del Rojo Congo a las fibrillas formadas, a las longitudes de onda 340, 390, 450, 475, 595 y 650 nm.

Debido a que las fibrillas amiloides de diversas proteínas tienen la capacidad de unirse a pequeñas moléculas planas, como por ejemplo el colorante específico de amiloide Rojo Congo, éste fue empleado para detectar la presencia de fibrillas tipo amiloides¹⁵. Por lo tanto, al evaluar el efecto inhibitorio de la formación de las antocianinas sobre las fibrillas amiloides, se observó una variación en el espectro de absorción del Rojo Congo, indicando estados de agregación / desagregación.

El colorante Rojo Congo fue preparado en 50 mM de buffer fosfato salino con 150 mM de NaCl, para obtener una concentración final de 6.2 μ M. Las proteínas agregadas se trabajaron a una concentración stock de 0.15 mg/mL en buffer fosfato (pH= 7.0), en 55% etanol incubadas por 24 horas.

Para los ensayos se consideró lo siguiente: 1) 80 μ L de RC y 20 μ L tripsina (control); 2) 80 μ L de RC, 20 μ L tripsina y 90.91 μ g/mL de antocianinas (ANT); 3) 80 μ L de RC, 20 μ L tripsina y 130.43 μ g/mL ANT; 4) 80 μ L de RC, 20 μ L tripsina y 166.67 μ g/mL ANT; 5) 80 μ L de RC, 20 μ L tripsina y 200 μ g/mL ANT; 6) 80 μ L de RC, 20 μ L tripsina y 230.77 μ g/mL ANT.

El porcentaje de inhibición se obtuvo comparando los promedios del pico máximo de absorbancia (a 475 nm) de cada ensayo donde estaban presentes las antocianinas, el Rojo Congo y la tripsina agregada, respecto al control (solo tripsina agregada más Rojo Congo, sin antocianinas). Se expresó como porcentajes de reducción (inhibición) de la agregación.

Ensayo de anti-agregación/desagregación de la proteína amiloide A β 1-42

Preparación del Rojo Congo (RC)

Se preparó una solución stock de 7.18 mM del colorante Rojo Congo en buffer PBS (pH= 7.4) y se filtró dos veces en papel whatman N°1 para prevenir los grumos agregados. De esta solución stock se preparó la solución de trabajo 11 μ M y se determinó su máxima absorción en un barrido continuo de lecturas, en lector de microplaca Biotek Synergy LX, en el rango de 400 – 600 nm, con intervalo de 10 nm. Para conservar la estabilidad de las lecturas, se hicieron lecturas a las 4 y 24 horas de preparado. Se realizaron 3 repeticiones independientes

para cada una de las longitudes de onda del barrido. La máxima absorción se encontró entre 490 y 510 nm, con un pico máximo en 500 nm.

Preparación de los agregados beta amiloides (A β 1-42)

El péptido A β 1-42 se disolvió en DMSO/NaOH 0.1 mM. Luego se diluyó en fosfato de sodio acuoso 10 mM. Previo a los ensayos, los oligómeros se diluyeron en buffer PBS y centrifugaron a 2300 RPM por 90 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se diluyó en PBS 40 mM (0.02% azida de sodio). Las soluciones de trabajo se llevaron a una concentración final de 50 μ M y se dividieron en alícuotas para los ensayos de anti-agregación y desagregación con las distintas concentraciones de ANT.

Ensayo de unión al Rojo Congo (RC)

Los ensayos de unión de RC-A β y RC-A β con ANT (a distintas concentraciones), fueron llevados a cabo en el lector de microplacas Biotek Synergy LX mediante barrido de absorbancias en el rango de longitudes de onda de 400-600 nm con intervalos de 10 nm. Se evaluó la antiagregación y desagregación del A β 1-42 por parte de las antocianinas. Como blanco se usó el PBS. Cada ensayo se realizó por triplicado, cuyos resultados de cada longitud de onda del barrido fueron promediados.

Ensayo de inhibición de la agregación (antiagregación) del A β 1-42 – 24 horas

Para evaluar la inhibición de los agregados fibrilares amiloides (A β) formados, se incubó 20 μ L de los agregados A β solo o con distintas concentraciones de antocianinas (47.62, 90.91, 130.43, 166.67 y 200 μ g/mL) por 24 horas a temperatura ambiente (22 °C). Luego, previo a la lectura, se agregó 80 μ L de Rojo Congo preparado anteriormente. Después de 20 minutos de reposo a temperatura ambiente, se realizaron las lecturas en lector de microplacas Biotek.

Ensayo de inhibición de la agregación (antiagregación) del A β 1-42 por 20 horas

El mismo experimento anterior se realizó para un tiempo de 20 horas a temperatura ambiente (22 °C) para las soluciones que contenían solo agregados A β o aquellas con distintas concentraciones de antocianinas (47.62, 90.91, 130.43, 166.67 y 200 μ g/mL).

Ensayo de desagregación del A β 1-42 preformado por 24 horas

Para evaluar la inhibición de los agregados fibrilares previamente formados, se incubó 20 μ L de los agregados A β por 24 horas a temperatura ambiente (22 °C). Luego, excepto al control, se adicionaron distintas concentraciones de antocianinas (47.62, 90.91, 130.43, 166.67 y 200 μ g/mL) e incubó por 4 horas adicionales a temperatura ambiente (22 °C). Previo a la lectura, se agregó 80 μ L de Rojo Congo. Después de 20 minutos de reposo y a temperatura ambiente, se realizaron las lecturas en lector de microplacas Biotek.

Estadística

Para el tratamiento de los datos empleó la hoja de cálculo Microsoft Excel 2010 y el software estadístico OriginLab - Microcal Origin 6.0. Los resultados se expresaron como el promedio y su desviación estándar para cada condición de tratamiento. La significación se determinó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se consideró un grado de significancia para $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de antocianinas totales (CAT)

En el presente trabajo, se determinó el contenido total de antocianinas monoméricas empleando el método de pH diferencial, el cual se basa en el cambio estructural del cromóforo de antocianinas entre pH de 1.0 y 4.5¹⁶. Se consideró como sustancia de referencia a la cianidina-3-glucósido debido a que esta sustancia es la más común en la naturaleza, con un coeficiente de extinción igual a 26 900 mol⁻¹. cm⁻¹ informado en la literatura para sistemas acuosos o alcohólicos. Si se desconoce la antocianina principal o su absorptividad, es apropiado calcular el contenido total de antocianina monomérica utilizando la absorptividad y el peso molecular de la cianidina-3-glucósido ($\epsilon = 26\ 900\ \text{L mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ y $\text{PM} = 449.2\ \text{g/mol}$)¹⁷.

De nuestros resultados obtenidos, el contenido de antocianinas monoméricas, en mg/L equivalentes de la cianidina-3-glucósido, presenta un mayor valor en solución metanólica ácida en comparación con la solución acuosa (280.69 y 32.95 mg/L, respectivamente) (tabla 1).

Tabla 1. Valores promedios del contenido de antocianinas monoméricas totales en los extractos acuoso y metanólico de atomizados de *Zea mays* L., variedad maíz morado.

Preparado	CAT (mg/L)*
Acuoso	32,95
Metanólico ácido	280,69

* Expresados como equivalentes de cianidina-3-glucósido (C3G).

Ensayo de anti-agregación de proteína plegada tipo amiloide.

Medida de turbidimetría

Las antocianinas (ANT) fueron evaluadas para su actividad antiagregante contra la tripsina inducida a tipo amiloide. Se observa una reducción de la turbidimetría que es proporcional al incremento en la concentración de antocianinas, lo cual indicaría una inhibición de la agregación de la tripsina. Comparados con el control (tripsina agregada tipo amiloide: T, sin la adición de las antocianinas), se observa reducciones significativas de la turbidez, del 45.38 y 66.61 % a concentraciones de 200 µg/mL y 230.77 µg/mL de antocianinas (figura 3, tabla 2).

Los porcentajes de reducción de la turbidez se obtuvieron comparando los valores promedios de las absorbancias de cada una de las soluciones que contiene la tripsina agregada (fibrillas tipo amiloide) con las distintas concentraciones de antocianinas respecto a la solución control que contiene solo tripsina agregadas (sin antocianinas) ensayadas a 350 nm.

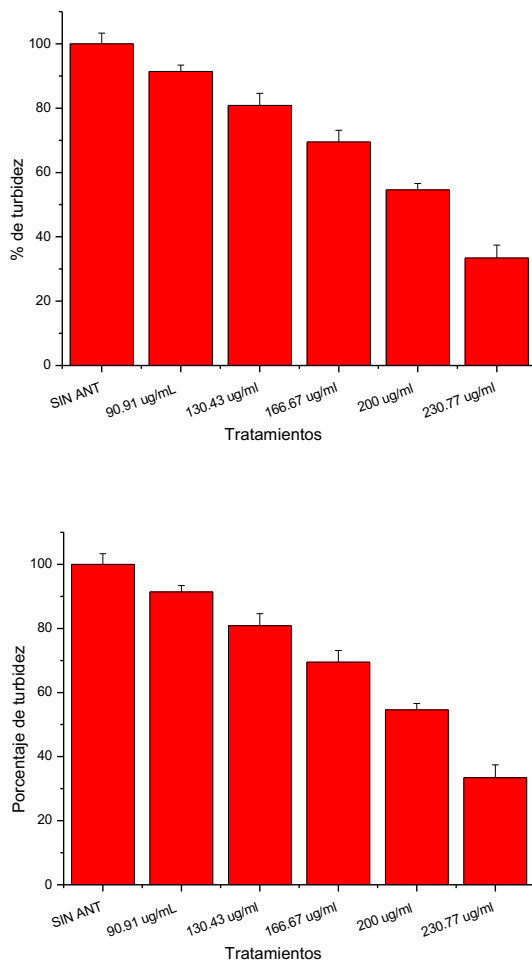


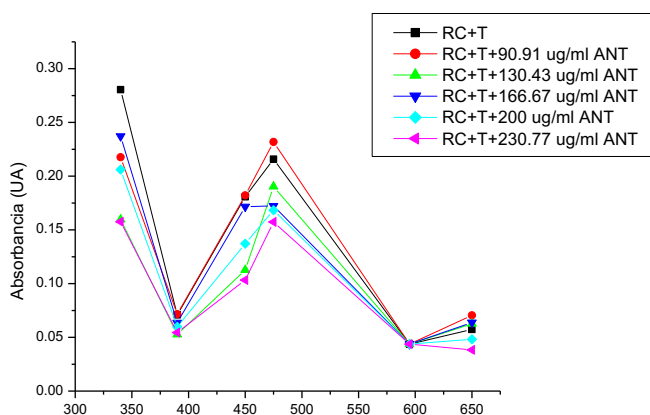
Figura 3. Variación de la turbidimetría en la formación de fibrillas tipo amiloide de las soluciones de tripsina (0.15 mg/mL) con distintas concentraciones de antocianinas (90.91, 130.43, 166.67, 200 y 230.77 µg/mL) y la solución control (tripsina sin antocianinas).

Tabla 2. Porcentajes de inhibición de las antocianinas sobre la agregación de tripsina inducida a tipo amiloide (Medida de turbidimetría).

Concentración de antocianinas ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancia	% Inhibición
0	0,55588	0
90,91	0,50813	8,59
130,43	0,44938	19,16
166,67	0,38625	30,52
200	0,30362	45,38
230,77	0,18563	66,61

Ensayo de unión al Rojo Congo (RC). Inhibición de la agregación.

Para la evaluación de la inhibición de la proteína agregada tipo amiloide, se consideró el pico máximo de absorbancia del complejo Tripsina -Rojo Congo (T-RC). Para este ensayo, la longitud de onda máxima fue de 475 nm (figura 4).

**Figura 4.** Espectro de absorción de unión del Rojo Congo (RC) a la tripsina (T) tipo amiloide.

Para la evaluación de la inhibición de la proteína agregada tipo amiloide, se consideró el pico máximo de absorbancia del complejo Tripsina -Rojo Congo (T-RC). Para este ensayo, la máxima absorción fue a 475 nm. El tratamiento control (T-RC), muestra una absorbancia de 0.2158, a partir del cual se evaluaron las distintas concentraciones de antocianinas. Excepto para la concentración más baja de antocianinas (90.91 $\mu\text{g/mL}$), la cual incrementa la absorción a 0.2318 (6.9 % mayor a la concentración del control), las demás concentraciones crecientes reducen proporcionalmente las lecturas de absorbancia. Así, las reducciones en porcentajes son: 11.8, 20.16, 22.01 y 27.11 % (para las cuatro siguientes mayores concentraciones de 130.43, 166.67, 200 y 230.77 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) en comparación a los niveles basales del tratamiento control (T-RC) (figura 4).

Ensayos de anti-agregación/desagregación de la proteína amiloide Aβ1-42

Con el fin de determinar la actividad antiagregante y/o desagregante por parte de las antocianinas, evaluamos el efecto in vitro de las antocianinas sobre la agregación de la proteína amiloide Aβ1-42 para 20 y 24 horas de incubación.

Ensayo de inhibición de la agregación (antiagregación) del Aβ1-42 por 24 horas

Para el ensayo de la inhibición de la agregación del Aβ1-42 para 24 horas de co-incubación, se observa una tendencia de disminución de las absorbancias del complejo Rojo Congo-agregados amiloides. Para la concentración más baja de antocianinas, 47.6190 µg/mL, se tiene un porcentaje de inhibición del complejo Rojo Congo-agregados amiloides del 14.63 %. Así, para la mayor de concentración de antocianinas, 200 µg/mL, el porcentaje de inhibición de la agregación aumenta significativamente a 33.54 % (figura 5, tabla 3). Los porcentajes de reducción de la agregación se obtuvieron comparando los valores promedios de los picos máximos de absorbancias a 500 nm (indicado con un trazo vertical figura 5) de cada una de las soluciones con antocianinas con respecto al control (sin antocianinas, solo el péptido, el Rojo Congo, Aβ y RC).

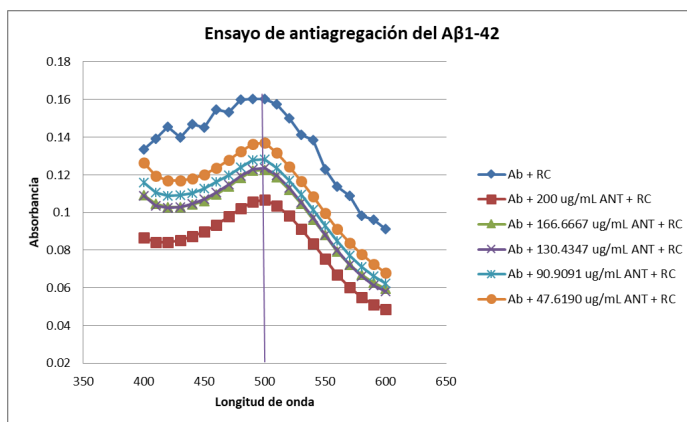


Figura 5. Efecto de la concentración de las antocianinas sobre la agregación del amiloide Aβ-42 (Ab en el gráfico) y el control [amiloides (Ab) incubado con el Rojo Congo] para un tiempo de incubación de 24 horas.

Tabla 3. Porcentajes de inhibición de las antocianinas en el Ensayo de inhibición de la agregación del Aβ1-42 (24 horas).

Concentración de antocianinas (µg/mL)	Absorbancia	% Inhibición
0	0.1604	0
47.62	0.1369	14.65
90.91	0.1282	20.07
130.43	0.1238	22.82
166.67	0.1227	23.5
200	0.1066	33.54

Ensayo de inhibición de la agregación (antiagregación) del A β 1-42 durante 20 horas.

Para el ensayo de la inhibición de la agregación del A β 1-42 para 20 horas de co-incubación, se observa una tendencia de disminución de las absorbancias del complejo Rojo Congo-agregados amiloides. Así, para la mayor de concentración de antocianinas, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el porcentaje de inhibición de la agregación aumenta significativamente al 30.74%. (figura 6, tabla 4). Los porcentajes de reducción de la agregación se obtuvieron comparando los valores promedios de los picos máximos de absorbancias a 500 nm (indicado con un trazo vertical, figura 6) de cada una de las soluciones con antocianinas respecto al control (sin antocianinas, solo el péptido, el Rojo Congo, A β y RC).

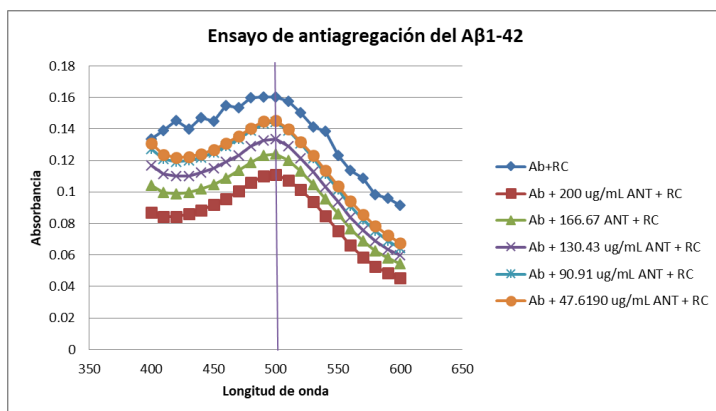


Figura 6. Efecto de la concentración de las antocianinas sobre la agregación del amiloide (Ab) para un tiempo de incubación de 20 horas.

Tabla 4. Porcentajes de inhibición de las antocianinas en el ensayo de inhibición de la agregación del A β 1-42 durante 20 horas.

Concentración de antocianinas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia	% Inhibición
0	0,1604	0
47,62	0,1455	9,29
90,91	0,1443	10,04
130,43	0,1337	16,65
166,67	0,1242	22,57
200	0,1111	30,74

Ensayo de la desagregación del A β 1-42 preformado durante 24 horas.

Para el ensayo del efecto de las antocianinas sobre la desagregación de las fibrillas A β 1-42 previamente formadas, se observa una tendencia de disminución de las absorbancias del complejo Rojo Congo-agregados amiloides. Además, se muestra que a una concentración de antocianinas mayor de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el porcentaje de inhibición de la desagregación aumenta significativamente a 26.63 % (figura 7, tabla 5). Los porcentajes de reducción de la desagregación se obtuvieron comparando los valores promedios de los picos máximos

de absorbancias a 500 nm (indicado con un trazo vertical en la figura 7) de cada una de las soluciones con antocianinas respecto al control (sin antocianinas, solo el péptido, el Rojo Congo, A β y RC).

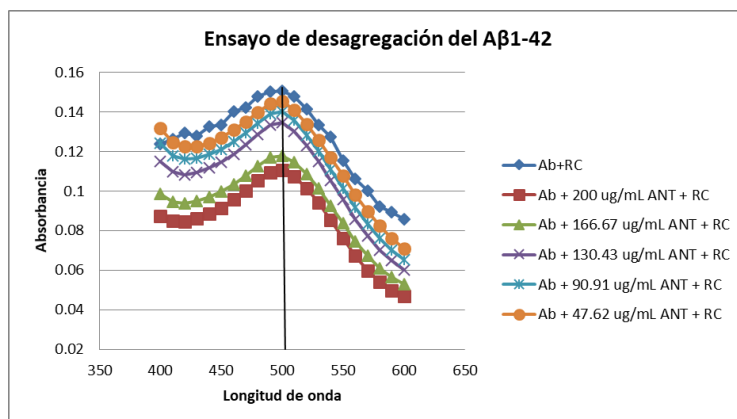


Figura 7. Efecto de la concentración de las antocianinas sobre la desagregación de las fibrillas amiloides [Ab] preformadas por 24 horas.

Tabla 5. Porcentajes de inhibición de las antocianinas en el ensayo de la desagregación del A β 1-42 preformado por 24 horas.

Concentración de antocianinas ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia	% Inhibición
0	0,1506	0
47,62	0,1455	3,39
90,91	0,14	7,04
130,43	0,1345	10,69
166,67	0,1177	21,85
200	0,1105	26,63

Se ha informado acerca de las concentraciones de antocianinas (95 – 150 mg/L) obtenidas a partir del maíz morado, según el tiempo y temperatura de extracción¹⁸. En comparación con estos valores, nuestros resultados del CAT son mayores para la extracción metanólica (280.9 mg/L).

El contenido de antocianinas, obtenido en la extracción metanólica ácida (280.69 mg/L), es mayor que la concentración de jugos y/o bebidas tal como el vino rojo, los jugos de fresa, arándano, incluso respecto a la sustancia estándar (cianidina-3-glucósido cloruro, 44.8 mg/L), pero es menor con respecto al contenido de antocianinas presente en la baya del saúco o la frambuesa¹³. A diferencia de nuestro trabajo, en este estudio comparativo se emplearon concentrados de jugos o extractos para sus mediciones.

Las concentraciones obtenidas en este trabajo expresadas en mg de cianidina-3-glucósido por 100 g de muestra, fueron 3420.5703 y 2009.1649, para la extracción metanólica y acuosa, respectivamente. Por lo tanto, nuestros valores de CAT son mayores con respecto a los componentes de cuatro variedades (3 genotipos mejorados y uno comercial) evaluadas en un estudio aparte, que incluyen dos genotipos (KKU OP e híbrido KKU F1) cuyos mayores valores son 408.54 y 289.06 mg/100 g equivalentes de cianidina-3-glucósido¹⁶.

Se ha informado que las concentraciones de antocianinas extraídas de las corontas de maíz morado a distintos tiempos y temperaturas fluctúan entre 11.567 y 37.127 mg/g, correspondiendo sus valores más altos a las mayores temperaturas de extracción (cuyo mayor valor promedio es 32,737 mg/g de coronta a partir de los 60 ° C)¹⁹. Estas concentraciones expresadas en mg de antocianinas por gramo de muestra, son de 34.23 y 20.09 mg/g, para las extracciones metanólica y acuosa respectivamente, siendo comparativamente similares a sus máximos valores, o incluso mayores si se comparan con sus valores de extracción a temperatura ambiente (16.279 mg/g).

La medida de turbidimetría fue usada como un indicador del grado de agregación de la tripsina, la cual es una buena herramienta para evaluar la formación de agregados más grandes. Con respecto a un estudio similar empleando extractos de meliloto y menta, se muestra una tendencia notable en la reducción de la turbidimetría en una relación dependiente de concentración, para diluciones que van desde los 5x hasta los 160x (5 hasta 160 veces). Las diluciones se realizaron a partir de una solución de 55 % etanol / 10 mM buffer fosfato. Cuanto más concentrados eran los extractos, presentan una mayor reducción en la turbidimetría (casi completa en el caso del meliloto)²⁰. En nuestro trabajo, obtuvimos una disminución máxima de la turbidimetría de las fibrillas del 66.61 % para una concentración de 230.77 µg/mL de antocianinas (concentración más alta en este estudio).

Asimismo, en estudios con extractos del clavo de olor se informa una significativa reducción de la turbidimetría (hasta el 10 %), y en los estudios con extractos de café existe una disminución centesimal (0.05) en el valor espectral del Rojo Congo, correspondiéndole un valor máximo de absorción, a partir del cual se evaluarían los extractos. En comparación con lo último mencionado, nuestros valores encontrados presentan mayores reducciones de unión al Rojo Congo (partiendo de un valor inicial de 0.2158 de absorbancia), lo cual se traduce en una mayor inhibición de la agregación. En otros trabajos realizados con extracto de semilla de pomelo y jugo de palta, se informan resultados similares a los encontrados en este trabajo en relación a la inhibición de la formación de fibrillas tipo amiloide²¹.

En un estudio de screening de diversas especias y hierbas, la menta, el pimiento rojo, la hierba buena y el tomillo, estos alimentos demostraron ser buenos inhibidores del polipéptido amiloide de los islotes (amilina), en su forma tóxica mediante el ensayo de unión a la tioflavina T la cual evalúa la fluorescencia proporcionalmente a la formación de agregados²². Sus valores de prevención de agregación fueron muy variados, variando desde 0 hasta más del 70 %, según la especie estudiada (de concentración única no mostrada). Comparado a nuestro resultado obtenido para la mayor concentración de antocianina empleada, se obtuvo un valor de 27.11 % de reducción de la agregación (figura 4).

En una aproximación sobre su capacidad de desagregación, las antocianinas muestran una significativa actividad desagregante (tabla 5, 26.63 %) sobre las fibrillas amiloides (A β 1-42) preformadas en comparación a los efectos inhibitorios de su agregación informados para el extracto de café y jugo de granada²³.

Además, se encontró que el extracto del aceite de la palma muestra una inhibición en la agregación del péptido A β 1-42 dependiente de dosis, a una concentración de inhibición IC₅₀ = 3.24 μ g/mL²⁴. Si bien sus proporciones de extracto para la lectura espectrofotométrica son distintas, nuestros resultados evaluados para el A β 1-42 evidencian una tendencia similar a la reducción en su agregación, dependiente de concentración. Recientemente, se están realizando estudios que proporcionan información a nivel molecular sobre cómo los polifenoles inhiben la formación de fibrillas A β , conocimiento que podría ser útil para diseñar inhibidores del amiloide. En estudios realizados con los extractos de pétalos de rosa, hojas de uva, así como varias de sus fracciones, se ha evidenciado que estos extractos inhibieron significativamente el proceso de agregación de péptidos amiloides A β 1-40 y A β 1-42 incubados durante tres días²⁵. Además, los fenoles presentes en los pétalos de rosa y hojas de uva desagregan hasta un 33 % los agregados preformados del péptido A β 1-42. Si bien sus evaluaciones se basaron en espectros de fluorescencia del complejo de la tioflavina T con el amiloide A β 1-42, nuestros resultados muestran una desagregación del 26.63 %.

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha determinado la concentración de las antocianinas obtenidas a partir de la especie *Zea mays* L (maíz morado) y se ha evidenciado que estas antocianinas poseen una significativa actividad de capacidad antiagregante/desagregante para los modelos de agregación con proteínas agregadas tipo amiloide y el péptido amiloide A β 1-42, las cuales son dependientes de la concentración.

Los resultados obtenidos en los ensayos de la inhibición de la agregación evidenciaron: a) reducción de la turbidimetría de la proteína agregada tipo amiloide; b) inhibición de la proteína agregada tipo amiloide a partir de la absorbancia del complejo proteína-Rojo Congo; c) inhibición de la agregación del A β 1-42 durante 20 y 24 horas de incubación, mientras que en los ensayos de la desagregación de las fibrillas A β 1-42 previamente formadas, evidenciaron una disminución de las absorbancias del complejo Rojo Congo-agregados amiloides y la disminución de la agregación que fue proporcional al incremento en la concentración de antocianinas.

Los resultados encontrados son alentadores para seguir investigando a las antocianinas como potenciales agentes biológicos que eviten algunas enfermedades.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos gentilmente la empresa SENSIENT Colors (ex Globe Natural) por proporcionarnos los atomizados de antocianinas. A IBRO (International Brain Research Organization) por su apoyo económico para una estadía en el extranjero. El presente trabajo fue parte de la Tesis de la Maestría en Biología Molecular, desarrollada en la FCB-UNMSM, del autor principal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB. Amyloid β -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *PNAS*. 2003; 100 (1): 330-335.
2. Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, et al. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002; 22(5): 1752-1762.
3. Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT. Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol*. 1997; 4(2): 119-125.
4. Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, et al. A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 24, 99(26): 16742-16747.
5. Serpell LC. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1502(1): 16-30.
6. Airoidi C, Sironi E, Dias C, Marcelo F, Martins A, Rauter AP, et al. Natural Compounds Against Alzheimer's Disease: Molecular Recognition of A β (1-42) Peptide by *Salvia Sclareoides* Extract and Its Major Component, Rosmarinic Acid, As Investigated by NMR. *Chem Asian J*. 2013; 8: 596-602.
7. Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2003; 87: 172-181.
8. Lao F, Sigurdson GT, Giusti MM. Health Benefits of Purple Corn (*Zea mays* L.) Phenolic Compounds. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2017; 16(2): 234-246.
9. Nakajima JI, Tanaka Y, Yamazaki M, Saito K., Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. *J Biol Chem*. 2001; 276(28): 25797-25803.
10. Yan Y, Chemler J, Huang L, Martens S, Koffas MA. Metabolic engineering of anthocyanin biosynthesis in *Escherichia coli*". *Appl Environ Microbiol*. 2005. 71 (7): 3617-3623.
11. Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Mol Nutr Food Res*. 2012, 56(1): 159-170.
12. Bhuiyan MI, Kim JY, Ha TJ, Kim SY, Cho KO. Anthocyanins Extracted from Black Soybean Seed Coat Protect Primary Cortical Neurons against in Vitro Ischemia. *Biol Pharm Bull*. 2012; 35(7): 999-1008.

13. Lee J, Durst R, Wrolstad RE. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *J AOAC Int.* 2005; 88(5): 1269–1278.
14. Kayser JJ, Arnold P, Steffen-Heins A, Schwarz K, Keppler JK. Functional ethanol-induced fibrils: Influence of solvents and temperature on amyloid-like aggregation of beta-lactoglobulin. *J Food Eng.* 2020; 270, 109764.
15. Espargaró A, Llabrés S, Saupé SJ, Curutchet C, Luque FJ, Sabaté R. On the Binding of Congo Red to Amyloid Fibrils. *Angew Chem Int Ed.* 2020; 59:1-5.
16. Sakunkan S, Surasak B, Bhornchai H. Anthocyanin content, total phenolic content, and antiradical capacity in different ear components of purple waxy corn at two maturation stages. *Aust J Crop Sci.* 2016; 10(5): 675-682.
17. HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res.* 2017; 61(1): 1-21.
18. Flores- Aguilar E, Flores-Rivera E. Estabilidad de Antocianinas, Fenoles totales y Capacidad Antioxidante de Bebidas de Maíz Morado (*Zea mays L.*) y Uña de Gato (*Uncaria tomentosa* sp). *Inf Tecnol.* 2018; 29(2): 175-184.
19. Gorriti Gutierrez A, Arroyo Acevedo J, Negron Ballarte L, Jurado Teixeira B, Purizaca Llajaruna H, Santiago Aquise I, et al. Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de las corontas del maíz morado (*Zea mays L.*): Método de extracción. *Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromát.* 2009; 8 (6): 509-518.
20. Kotormán M, Kelemen Z, Kasi P, Nemcsók J. Inhibition of the formation of amyloid-like fibrils using herbal extracts. *Acta Biol Hung.* 2018; 69(2): 125–134.
21. Kasi P, Kotormán M. Avocado Juice Prevents the Formation of Trypsin Amyloid-Like Fibrils in Aqueous Ethanol. *Nat Prod Commun.* 2019; 14(5): 1–5.
22. Fuentes AL, Hennessy K, Pascual J, Pepe N, Wang I, Santiago A. Identification of plant extracts that inhibit the formation of diabetes-linked IAPP Amyloid. *J Herb Med.* 2016; 6: 37-41.
23. Kasi P, Kotormán M. Among Commercially Available Fruit Juices, Pomegranate Is the Most Effective Inhibitor of PMS-Trypsin Amyloid-Like Fibrils Formation. *Nat Prod Commun.* 2019; 14(6): 1–5.
24. Weinberg RP, Koledova VV, Shin H, Park JH, Tan YA, Sinskey AJ, Sambanthamurthi R, Rha C. Oil Palm Phenolics Inhibit the In Vitro Aggregation of β -Amyloid Peptide into Oligomeric Complexes. *Int J Alzheimer's Dis.* 2018: 1-12.
25. Sharoyan SG, Antonyan AA, Harutyunyan HA, Mardanyan SS. Plant preparations suppress the aggregation of amyloid beta peptides and promote their disaggregation. *Proc Yerevan State Univ. Chem Biol.* 2015; 3: 39-46.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS HOJAS DE *Senecio rufescens* DC

Enrique Javier Aguilar Felices^a, Pablo Enrique Bonilla Rivera^b,
Edwin Carlos Enciso Roca^a,

RESUMEN

Senecio rufescens DC es una planta altoandina utilizada tradicionalmente para tratar problemas del “mal de altura” y de dolencias gastrointestinales. En el proceso de adaptación a condiciones extremas, desarrolló su capacidad para biosintetizar metabolitos secundarios de gran importancia terapéutica como son los compuestos fenólicos. Por tanto, esta investigación se desarrolló con el objetivo de determinar el contenido de fenoles totales, flavonoides, flavonoles y la capacidad antioxidante del extracto metanólico de las hojas y de sus fracciones de *n* – hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanólica, respectivamente. La fracción metanólica, mostró el mayor contenido de fenoles totales ($149,81 \pm 5,02$ GAE/g de extracto), flavonoides ($47,33 \pm 2,27$ QE/g de extracto) y flavonoles ($14,34 \pm 0,69$ QE/g de extracto) ($p < 0,05$), respectivamente, mientras que su capacidad antioxidante ($529,80 \pm 14,30$; $444,38 \pm 11,31$; $406,86 \pm 24,58$ μ moles ET/g de extracto, para los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente) fue superior a las otras fracciones ($p < 0,05$). Se concluye que la fracción metanólica del extracto metanólico, demostró poseer un alto contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles, así como, una alta capacidad antioxidante, respectivamente.

Palabras clave: *Senecio rufescens* DC., compuestos fenólicos, capacidad antioxidante.

ANTIOXIDANT CAPACITY OF EXTRACTS OBTAINED FROM LEAVES OF *Senecio rufescens* DC.

ABSTRACT

Senecio rufescens DC. is a South American Andean plant traditionally used to treat “altitude sickness” and gastrointestinal ailments. In the process of adaptation to extreme conditions, it developed its ability to biosynthesize secondary metabolites of great therapeutic importance such as phenolic compounds. Therefore, this research was developed with the objective

^a Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Av. Independencia s/n Ciudad Universitaria, Ayacucho, Perú,

*enrique.aguilar@unsch.edu.pe

^b Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

of determining of total phenols, flavonoids, flavonols and the antioxidant capacity of the methanolic extract of the leaves and its fractions of *n* - hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanolic, respectively. The methanolic fraction showed the highest content of total phenols ($149,81 \pm 5,02$ GAE/g of extract), flavonoids ($47,33 \pm 2,27$ QE/g of extract) and flavonols ($14,34 \pm 0,69$ QE/g of extract) ($p < 0,05$), while, its antioxidant capacity ($529,80 \pm 14,30$; $444,38 \pm 11,31$; $406,86 \pm 24,58$ μ moles ET/g of extract, for the DPPH, ABTS and FRAP tests, respectively) was higher than the other fractions ($p < 0,05$). It is concluded that the methanolic fraction of the methanolic extract was shown to have a high content of total phenols, flavonoids and flavonols, as well as a high antioxidant capacity, respectively.

Key words: *Senecio rufescens* DC., phenolic compounds, antioxidant capacity.

INTRODUCCIÓN

El género *Senecio*, es uno de los géneros más diversos de la familia Astearaceae con más de 1500 especies y en el Perú se han reportado 177 especies con distribución restringida, consideradas como endémicas y adaptadas a altitudes superiores a 4000 msnm¹. Se caracterizan por tener en su composición química monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenoides, esteroides, flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos y alcaloides². Se ha reportado que extractos obtenidos de las partes aéreas de otras especies de *Senecio* tienen actividad antioxidante, en las cuales se hicieron responsables de dicha actividad a los compuestos fenólicos^{3,4,5}.

S. rufescens DC, es un arbusto erguido de 40 – 70 cm de altura, parcialmente caducifolio hacia la base, tallos densamente hojosos hacia el ápice; hojas sésiles, dispuestas en fascículos laterales, lineares a linear – lanceoladas, enteras, márgenes conspicuamente resolutas, densamente glanduloso – pubescente en ambas caras, de 2 a 3 cm de longitud por 1,5 a 3 mm de ancho; inflorescencias en cabezuelas discoideas, solitarias, en el ápice de las ramas laterales; involucrio acampanulado de 8 – 10 mm de largo por 10 mm de diámetro; brácteas involucrales lineal – lanceoladas, glandulosas, pubescentes en el dorso; flores isomorfas, hermafroditas; corola tubulosa, amarillento – parduzco, pentalobulada, fruto aquenio cilíndrico, con numerosas cerdas o pelos blancos⁶. Su adaptación a la altitud, se debe a su capacidad de tolerar el estrés biótico y abiótico, tales como, salinidad, radiación solar, temperaturas extremas, sequías y para hacer frente a sus depredadores, para el cual biosintetizan compuestos fenólicos, alcaloides y otros compuestos como mecanismos de adaptación y defensa⁷. Tradicionalmente es utilizada para dolencias estomacales y el “mal de altura”⁶.

La búsqueda de antioxidantes de origen vegetal es una preocupación permanente en la actualidad, para así poder prevenir y controlar a las enfermedades relacionadas al estrés oxidativo, tales como el envejecimiento celular, enfermedades degenerativas, diabetes, y cáncer⁴.

En el Perú, se han realizado pocos estudios sobre el contenido de compuestos fenólicos⁸ y capacidad antioxidante en especies endémicas del género *Senecio*, en particular no existen reportes para *S. rufescens* DC, el cual nos motivó a realizar esta investigación con el objetivo de determinar: el contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles; y su capacidad antioxidante utilizando los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP del extracto metanólico de las hojas de *S. rufescens* DC., y de sus fracciones de *n* – hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanólico, respectivamente.

PARTE EXPERIMENTAL

Muestra vegetal

Un kilogramo de hojas frescas de *S. rufescens* DC. fueron recolectadas en el distrito de Paras, provincia de Cangallo (Ayacucho – Perú) a una altura de 4756 msnm, la localización exacta fue longitud – 74,74177187188302 y latitud -13,358120254734844. La especie fue certificada por el Mg. Hamilton Beltrán del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, dejándose una muestra en dicha institución.

Preparación de la muestra

Las hojas fueron desecadas a la sombra hasta sequedad, después fueron triturados utilizando una licuadora hasta obtener un polvo fino y conservado en refrigeración en un frasco ámbar hasta su uso.

Obtención del extracto metanólico

100 g de muestra pulverizada desecada fue extraída con dos litros de metanol (4 x 500 mL) por maceración dinámica durante cuatro horas utilizando un agitador magnético, se filtró el extracto, se reunieron los filtrados y se concentraron en un evaporador rotatorio hasta sequedad, obteniéndose un extracto seco, que fue conservado en refrigeración a 4 °C, hasta su posterior uso. Se pesó el extracto y se determinó el porcentaje de rendimiento en relación a 100 g de muestra seca en polvo.

Fraccionamiento del extracto metanólico por cromatografía en columna

Una columna cromatográfica de vidrio (1,5 cm x 60 cm) fue empacada con 25 g de silica gel 60 para columna cromatográfica (70 – 230 mesh, Merck ®) y eluida con *n* - hexano. 5 g del extracto metanólico se mezcló con silica gel y se añadió a la columna cromatográfica. Seguidamente se realizaron eluciones sucesivas con 100 mL de *n* – hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol, respectivamente. Se colectó cada una de las fracciones y se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio hasta obtener un extracto seco; y conservados en refrigeración a 4 °C hasta su uso. Se pesó cada uno de los extractos y se determinó el porcentaje de rendimiento en relación a 5 g de extracto metanólico utilizado para el fraccionamiento.

Determinación del contenido de fenoles totales

Se utilizó el método del reactivo Folin – Ciocalteu⁹. La muestra se preparó a la concentración de 1 mg/mL en metanol. 150 µL de la muestra fue mezclada con 150 µL del reactivo de Folin – Ciocalteu (Merck ®) 0,25 N; 2400 µL de agua destilada, se mezcló por 5 min y se dejó en reposo por 3 min. Luego se añadió 300 µL de solución de carbonato de sodio 1N. La mezcla fue incubada en la oscuridad por 2 h a temperatura ambiente. La absorbancia fue leída a 725 nm (Espectrofotómetro UV – Vis GENESYS 150 – THERMO SCIENTIFIC), contra un blanco de reacción. Una curva de calibración fue preparada con ácido gálico (0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 µg/mL). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. El contenido de fenoles totales fue expresado como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto (mg GAE/g de extracto)

Determinación del contenido de flavonoides

Se realizó según el método descrito por Zhishen y col.¹⁰, con ligeras modificaciones. La muestra se preparó a la concentración de 1 mg/mL. En un tubo de ensayo, se mezcló 500 µL del extracto con 500 µL de agua destilada y 150 µL de nitrito de sodio al 5 %. Después de 5 min, se adicionó 150 µL de cloruro de aluminio al 10 %. Luego de 6 min, 2 mL de hidróxido de sodio al 4 % se adicionó a la mezcla. Finalmente, se completó hasta 5 mL con agua destilada y se mezcló bien en un vortex; y se dejó en reposo por 15 min a temperatura ambiente en ausencia de luz. La absorbancia fue leída a 510 nm (Espectrofotómetro UV – Vis GENESYS 150 – THERMO SCIENTIFIC), contra un blanco de reacción. Una curva de calibración fue preparada con quercetina (40,0; 80,0; 120,0; 160,0; 200,0 µg/mL). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. El contenido de flavonoides fue expresado como mg equivalentes de quercetina por g de extracto (mg QE/g de extracto).

Determinación del contenido de flavonoles

Se determinó por el método descrito por Miliauskas y col.¹¹. La muestra se preparó a la concentración de 1 mg/mL. 500 µL del extracto fue mezclado con 1 mL de cloruro de aluminio al 4 % y 3 mL de acetato de sodio al 5 %. La mezcla se dejó en reposo por 2,5 horas a 20°C. La absorbancia fue leída a 440 nm (Espectrofotómetro UV – Vis GENESYS 150 – THERMO SCIENTIFIC), contra un blanco de reacción. Se preparó una curva de calibración con quercetina (0,0; 4,0; 6,0; 8,0; 16,0; 20,0 µg/mL). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. El contenido de flavonoles fue expresado como mg equivalentes de quercetina por g de extracto (mg QE/g de extracto).

Determinación de actividad antioxidante por método de secuestramiento del radical libre 1,1 – difenil – picril – hidrazilo (DPPH)

Se desarrolló el procedimiento descrito por Brand – Williams y col., modificado por Thaipong y col.,⁹ y ajustada a las condiciones de nuestro laboratorio. La muestra se preparó a la concentración de 1 mg/mL. Se preparó una solución stock del radical libre DPPH de 20 mg/L en metanol. Se midió la absorbancia a 517 nm y se ajustó a $0,7 \pm 0,2$ con metanol. Se midió 500 µL del extracto y se adicionó a 2000 µL de la solución del DPPH y se mezcló en un vortex. La mezcla fue incubada en la oscuridad por 30 min y la absorbancia fue leída a 517

nm (Espectrofotómetro UV – Vis GENESYS 150 – THERMO SCIENTIFIC). El porcentaje de la actividad secuestradora del radical libre se calculó de acuerdo a la siguiente relación:

$$\% \text{ de actividad secuestradora del DPPH} = \left[\frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{MP}}}{A_{\text{DPPH}}} \right] \times 100$$

En donde ADPPH y AMP corresponden a las absorbancias del DPPH, muestra problema tratada con DPPH, respectivamente.

Asimismo, se preparó una curva estándar con Trolox (25 – 800 μ moles) y los resultados fueron expresados como μ moles equivalentes a Trolox por gramo de extracto (μ mol ET/g de extracto).

Determinación de actividad antioxidante por el método de secuestro del catión radical del ácido 2,2'- azinobis – (3 – etilbenzotiazolina) – 6 - sulfónico (ABTS^{•+})

Se utilizó el protocolo descrito por Arnao y col., modificado por Thaipong y col⁹. La muestra se preparó a la concentración de 1 mg/mL en metanol. La solución patrón (SP), estuvo constituida por 7,4 mM de ABTS y 2,6 mM de persulfato de potasio. La solución de trabajo (ST) se preparó a partir de 1 mL de SP disuelto en metanol y se ajustó la absorbancia a 1,1 \pm 0,02 diluyendo con metanol a la longitud de onda de 734 nm (Espectrofotómetro UV – Vis GENESYS 150 – THERMO SCIENTIFIC). 150 μ L de la muestra fue mezclado con 2850 μ L de solución de ABTS^{•+} y se dejó en la oscuridad por 2 h y la absorbancia fue leída a 734 nm. Se calculó el porcentaje de captación del radical libre utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de actividad secuestradora del ABTS} = \left[\frac{A_{\text{ABTS}} - A_{\text{MP}}}{A_{\text{ABTS}}} \right] \times 100$$

En donde AABTS y AMP corresponden a las absorbancias del ABTS^{•+} y la muestra problema tratada con ABTS^{•+}, respectivamente.

Asimismo, se preparó una curva estándar con Trolox (25 – 600 μ moles). Los resultados fueron expresados como μ moles equivalentes de Trolox por g de extracto (μ mol ET/g de extracto).

Determinación de actividad antioxidante por el método de reducción de hierro (FRAP)

Se aplicó el procedimiento descrito por Benzey y Strain modificada por Thaipong y col⁹. La muestra se preparó a la concentración de 1 mg/mL en metanol. La solución patrón incluyó 300 mM de buffer acetato pH 3,6; 10 mM TPTZ (2, 4, 6 – tripiridil – triazina) disuelto en una solución de HCl 40 mM y 20 mM de solución de FeCl₃ en agua. La solución de trabajo (ST) se obtuvo mezclando 25 mL de buffer acetato, 2,5 mL de solución de TPTZ y 2,5 mL de la solución de FeCl₃, la misma que fue calentada a 37°C antes de su uso. 150 μ L de muestra fue mezclada con 2850 μ L de solución ST y se dejó en reposo por 30 minutos; y la absorbancia fue leída a 593 nm (Espectrofotómetro UV – Vis GENESYS 150 – THERMO SCIENTIFIC). Una curva estándar fue preparada con Trolox (25 – 800 μ moles). Los resultados fueron expresados como μ moles equivalentes de Trolox por g de extracto (μ moles ET/g de extracto).

Análisis de datos

En la determinación del contenido de compuestos fenólicos, flavonoides, flavonoles y la capacidad antioxidante por los métodos del DPPH, ABTS y FRAP, los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de tres repeticiones. El análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples de Scheffé fueron utilizados para demostrar las diferencias significativas entre los extractos con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Rendimiento del extracto metanólico de las hojas de *S. rufescens* DC. y de sus fracciones.

Extracto y/o fracción	Peso de muestra (g)	Peso seco de extracto y/o fracción (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
Extracto metanólico	100	40	40,00
Fracción de <i>n</i> – hexano	5	0,66	14,18
Fracción de diclorometano	5	1,85	39,79
Fracción de acetato de etilo	5	0,86	18,52
Fracción metanólica	5	1,28	27,51

Tabla 2. Contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles del extracto metanólico de *S. rufescens* DC. y de sus fracciones.

Extracto/ Fracción	Fenoles totales (mg GAE/g de extracto)	Flavonoides (mg QE/g de extracto)	Flavonoles (mg QE/g de extracto)	Relación	
				Flavonoides / Fenoles totales	Flavonoles/ flavonoides
Extracto Metanólico	64,5 \pm 1,17 ^b	36,55 \pm 1,91 ^c	10,58 \pm 0,85 ^c	0,57	0,29
Fracción de <i>n</i> – hexano	N.D.	N.D.	N.D.		
Fracción Diclorometano	44,32 \pm 1,6 ^a	17,27 \pm 1,64 ^a	6,48 \pm 0,34 ^b	0,39	0,38
Fracción de Acetato de etilo	74,46 \pm 1,6 ^c	28,06 \pm 1,1 ^b	2,92 \pm 0,23 ^a	0,38	0,1
Fracción Metanólica	149,81 \pm 5,02 ^d	47,33 \pm 2,27 ^d	14,34 \pm 0,69 ^d	0,32	0,3
Valor <i>p</i>	< 0,05	< 0,05	< 0,05		

Los resultados son el promedio \pm D.E. de tres determinaciones, las letras con superíndices diferentes significan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 3. Capacidad antioxidante del extracto metanólico de las hojas de *S. rufescens* DC. y de sus fracciones.

Extracto/ Fracción	DPPH		ABTS		FRAP (μ moles ET/g de muestra)
	%	μ moles ET/g de muestra	%	μ moles ET/g de muestra	
Extracto	13,61 \pm	76,97 \pm	27 \pm	172,38 \pm	188,68 \pm
Metanólico	0,84 ^b	7,17 ^b	1,57 ^b	10,78 ^b	2,76 ^b
Fracción	2,66 \pm	0 ^a	15,28 \pm	91,71 \pm	160,8 \pm
<i>n</i> – hexano	0,93 ^a	0 ^a	1,51 ^a	10,42 ^a	1,66 ^{ab}
Fracción	3,96 \pm	0 ^a	14,44 \pm	85,93 \pm 4 ^a	124,89 \pm
Diclorometano	0,47 ^a	0 ^a	0,58 ^a		0,17 ^a
Fracción	23,27 \pm	159,82 \pm	25,52 \pm	162,16 \pm	244,59 \pm
Acetato de etilo	3,41 ^c	29,24 ^c	1,25 ^b	8,6 ^b	3,18 ^c
Fracción	66,41 \pm	529,80 \pm	66,54 \pm	444,38 \pm	406,86 \pm
Metanólica	1,67 ^d	14,3 ^d	3,07 ^c	11,31 ^c	24,58 ^d
Valor <i>p</i>	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Los resultados son el promedio \pm D.E. de tres determinaciones, las letras con superíndices diferentes significan diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la tabla 1 se muestra el rendimiento del extracto metanólico de las hojas de *S. rufescens* DC., y de cada una sus fracciones. Se obtuvo un rendimiento de 40 % de extracto metanólico, un porcentaje muy alto, posiblemente porque hemos utilizado metanol sin dilución y por haber realizado una extracción dinámica por agotamiento (4 x 500 mL); y no una maceración simple. Mientras que en las fracciones, la fracción de diclorometano mostró el mayor porcentaje (39,79 %), seguido de las fracciones metanólica (27,51 %), acetato de etilo (18,52 %) y *n* – hexano (14,18 %), respectivamente. El fraccionamiento del extracto metanólico permitió separar los compuestos químicos presentes en el extracto de acuerdo a su polaridad, en el cual la fracción de diclorometano tuvo mayor porcentaje, mientras que la fracción de *n* - hexano tuvo menor porcentaje. Estas diferencias entre las fracciones se deben a la naturaleza y polaridad de los compuestos presentes en cada uno de las fracciones.

En estudios realizados con especies del género *Senecio* se han utilizado diferentes solventes para realizar la extracción de compuestos bioactivos a partir de sus partes aéreas, en el caso de *S. clivicolus* Wedd. se utilizó etanol al 96 %⁴, en *S. scandens* Buch.-Ham. etanol al 80 %¹² y en *S. glaucus* subsp *coronopifolius* (Maire) C. Alexander. metanol al 70 %¹³, con 27,06 %; 6,25 % y 7,5 % de rendimiento, respectivamente. En *S. scandens* Buch.-Ham.¹² y en *S. glaucus* subsp *coronopifolius* (Maire) C. Alexander.¹³, se utilizó maceración simple por agotamiento por siete días, mientras que, en *S. clivicolus* Wedd.⁴ se utilizó maceración dinámica obteniéndose mejores resultados, pero que es inferior al nuestro.

La literatura reporta que los terpenos, tales como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos, están presentes en cantidades significativas en especies del género *Senecio*²,

compuestos que pueden ser solubilizados en diclorometano y posiblemente a esto se deba el porcentaje elevado de esta fracción en *S. rufescens* DC. Asimismo, se ha reportado en otras especies del género *Senecio*, el fraccionamiento por partición líquido – líquido con solventes de polaridad creciente. En el caso de *S. glaucus* L., el extracto etanólico se fraccionó con *n* – hexano, cloroformo y *n* – butanol, obteniéndose 13,33 %, 21,76 % y 36,67 % de rendimiento³, mientras que en *S. clivicolus* Wedd. el extracto etanólico al 96 % fue fraccionado con *n* – hexano, cloroformo, acetato de etilo y *n* – butanol, obteniéndose 8,61 ± 0,75 %; 63,39 ± 5,23 %; 6,87 ± 0,39 % y 13,53 ± 0,95 % de rendimiento⁴, respectivamente. Nuestros resultados se acercan a este último, en el cual, la fracción de cloroformo tuvo el mayor porcentaje y la de *n* - hexano el menor porcentaje.

Por otro lado, en la tabla 2 presentamos el contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles presentes en el extracto metanólico de las hojas de *S. rufescens* DC. y de sus fracciones. Se observa que estos varían desde el extracto metanólico (64,5 ± 1,17 mg GAE/g de extracto; 36,55 ± 1,91 mg QE/g de extracto y 10,58 ± 0,85 mg QE/g de extracto, respectivamente), y en cada una de las fracciones en función de su polaridad. La fracción de acetato de etilo (74,46 ± 1,6 mg GAE/g de extracto; 28,06 ± 1,1 mg QE/g de extracto y 2,92 ± 0,23 mg QE/g de extracto, respectivamente) y la fracción metanólica (149,81 ± 5,02 mg GAE/g de extracto; 47,33 ± 2,27 mg QE/g de extracto y 14,34 ± 0,69 mg QE/g de extracto, respectivamente), mostraron el mayor contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles. La fracción metanólica tiene los valores más altos de los tres compuestos, posiblemente porque están unidos a restos azucarados que les proporciona mayor polaridad y por ende solubilidad en solventes más polares. Las diferencias estadísticas entre el contenido de estos tres compuestos en el extracto metanólico y en cada una de sus fracciones fueron significativas ($p < 0,05$).

Existen reportes en la literatura sobre el contenido de fenoles totales en el género *Senecio*, cuyos rangos varían desde 2,46 ± 0,11 mg GAE/g de extracto en el extracto acuoso de *S. anteuphorbium* (L) Sch.Bip.,¹⁴ hasta 170,11 ± 1,49 mg GAE/g de extracto en la fracción de acetato de etilo de *S. clivicolus* Wedd.⁴ de sus partes aéreas, respectivamente. En nuestro estudio, hemos hallado que la fracción metanólica del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. rufescens* DC. tuvo un contenido relativamente alto de fenoles totales (149,81 ± 5,02 mg GAE/g de extracto).

En el caso de los flavonoides, también la literatura reporta un contenido variable que va desde 2,5 ± 0,2 mg EQ/g de hoja seca en una infusión de hojas de *S. viridis* Phil., hasta 35,9 ± 0,17 mg EQ/g de extracto del extracto metanólico de hojas de *S. glaucus* subsp *coronopifolius* (Maire) C. Alexander.¹³ En nuestro estudio obtuvimos valores de 36,55 ± 1,91; 28,06 ± 1,1 y 47,33 ± 2,27 mg EQ/g de extracto, del extracto metanólico y de las fracciones de acetato de etilo y metanólica, respectivamente; demostrándose que *S. rufescens* DC., posee un contenido significativo de flavonoides respecto a otras especies del género *Senecio* reportada en la literatura. Asimismo, determinamos la relación entre el contenido de flavonoides y fenoles totales en las fracciones de diclorometano, acetato de etilo y metanólica, en la cual los flavonoides representaron aproximadamente un tercio del contenido de fenoles totales en dichas fracciones.

Nosotros también hacemos el primer reporte del contenido de flavonoles en especies del género *Senecio*. En nuestro estudio, el contenido de flavonoles en el extracto metanólico y en las fracciones de diclorometano, acetato de etilo y metanólica fueron $10,58 \pm 0,85$; $6,48 \pm 0,34$; $2,92 \pm 0,23$; $14,34 \pm 0,69$ mg QE/ de extracto, respectivamente. Estos representaron también aproximadamente un tercio del contenido de flavonoides en las fracciones de diclorometano y metanólica, respectivamente. En el género *Senecio* es recurrente la presencia de flavonoles como kaempferol, quercetina, myricetina y fisetina, tanto como agliconas libres y sus derivados glicosilados^{2,4,12}.

Esta diferencia entre el contenido de fenoles totales y de flavonoides en el género *Senecio*, nos permite asumir que está cubierta por otros compuestos fenólicos, tales como ácidos fenólicos derivados del ácido clorogénico y de ácidos dicafeoilquínicos, entre otros compuestos fenólicos, quienes también poseen la habilidad para neutralizar radicales libres⁴.

Mientras que en la tabla 3 mostramos los resultados de la capacidad antioxidante del extracto y de sus fracciones de las partes aéreas de *S. rufescens* DC. En la cual, la fracción metanólica tiene la más alta capacidad antioxidante (DPPH: $66,41 \pm 1,67$ %; $529,80 \pm 14,30$ μ moles ET/g de extracto; ABTS: $66,54 \pm 3,07$ %; $444,38 \pm 11,31$ μ moles ET/g de extracto; y FRAP: $406,86 \pm 24,58$ μ moles ET/g de extracto, respectivamente), seguido del extracto metanólico ($13,61 \pm 0,84$ %; $76,97 \pm 7,17$ μ moles ET/g de extracto; ABTS: $27 \pm 1,57$ %; $172,38 \pm 10,78$ μ moles ET/g de extracto; y FRAP: $188,68 \pm 2,76$ μ moles ET/g de extracto, respectivamente). Asimismo, hallamos diferencias significativas entre la capacidad antioxidante del extracto metanólico y de cada una de las fracciones para los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP ($p < 0,05$), respectivamente.

Los ensayos de DPPH y ABTS, son ensayos que miden la capacidad de secuestro de radical libre. En el caso del ensayo del DPPH⁹, este se realiza en medio metanólico, por tanto, comprende antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos presentes en el extracto y en sus fracciones, en el cual se mide la decoloración del reactivo de color violeta a amarillo a 517 nm. Mientras que en el caso del ABTS⁹, este se desarrolla en medio acuoso, por tanto, se aborda principalmente a los antioxidantes hidrofílicos, en el cual el catión ABTS⁺ formado en el medio de reacción, se decolora de verde azulado intenso a verde azulado pálido, el cual se mide a 734 nm. Por otro lado, el ensayo del FRAP⁹ se fundamenta en la capacidad reductora del catión Fe³⁺ presente como un complejo formado con TPTZ que es de color violáceo a Fe²⁺, resultando en una intensificación del color violáceo, por ende, se incrementa su absorbancia cuando es leída a 593 nm. Por lo tanto, la decoloración de los radicales libres DPPH y ABTS se debe a la presencia de antioxidantes capaces de donar un protón a dichos radicales libres y en el caso del ensayo FRAP, se debe a la capacidad reductora del catión Fe³⁺ por parte de grupos hidroxilos. Estos compuestos, están presentes en el extracto metanólico de las hojas de *S. rufescens* DC., y de sus fracciones, principalmente como compuestos fenólicos¹⁵, tal como ha sido mostrado en la tabla 2.

Sólo existe un reporte en el género *Senecio*, en el cual, se evaluó la capacidad antioxidante utilizando los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente. En dicho reporte, la fracción

de acetato de etilo (DPPH: $317,53 \pm 5,81$ mg ET/g de extracto; ABTS: $409,53 \pm 9,53$ mg ET/g de extracto; y FRAP: $507,66 \pm 5,26$ mg ET/g de extracto, respectivamente) del extracto etanólico de las partes aéreas de *S. clivicolus* Wedd., tuvo mayor capacidad antioxidante que la fracción butanólica (DPPH: $119,54 \pm 6,71$ mg ET/g de extracto; ABTS: $208,37 \pm 3,21$ mg ET/g de extracto; y FRAP: $184,18 \pm 4,59$ mg ET/g de extracto, respectivamente)⁴. En nuestro estudio, con el ensayo de DPPH se obtuvieron valores más altos que con el ensayo FRAP, mientras que, en *S. clivicolus* Wedd., se obtuvieron resultados opuestos. Asimismo, nosotros obtuvimos una mayor capacidad antioxidante en la fracción metanólica obtenida a partir del extracto metanólico, mientras que en *S. clivicolus* Weed., se obtuvo la mayor actividad en la fracción de acetato de etilo del extracto etanólico. Esta diferencia se debe posiblemente a la naturaleza y concentración de los compuestos con capacidad antioxidante presentes en dichas fracciones y, asimismo, al origen de la muestra, puesto que *S. clivicolus* Wedd., fue colectada en el departamento de Potosí (Bolivia) a una altitud de 3750 msnm, mientras que nuestra muestra de *S. rufescens* DC., fue colectada a 4756 msnm.

En la literatura se reporta el caso del estudio de la actividad antioxidante del fruto de un cultivar de *Vaccinium corymbosum* L. y de 14 cultivares de *Vaccinium ashei* Reade “arandano”, en el cual, el rango de los resultados del ensayo de DPPH (1014,20 a 2055,06 μ moles ET/100g) fueron superiores al del ensayo de FRAP (699,78 a 1740,25 μ moles ET/100g)¹⁶, respectivamente. Por tanto, si bien estos resultados corresponden a otras especies, son compatibles con nuestro resultado, el de obtener valores más altos para el ensayo de DPPH respecto al de FRAP.

En consecuencia, con los resultados obtenidos podemos afirmar que el extracto metanólico y las fracciones de acetato de etilo y metanólica de las partes aéreas de *S. rufescens* DC., tienen compuestos con alta capacidad antioxidante, en el cual, los responsables de dicha actividad serían los compuestos fenólicos conformados por ácidos fenólicos y flavonoides principalmente, que pueden estar presentes ya sea como compuestos libres o agliconas y también como glicósidos, que son más solubles en solventes más polares como el metanol, destacando este último en nuestro estudio, por mostrar mayor capacidad antioxidante. *S. clivicolus* Wedd.⁴ y *S. scandens* Buch.-Ham.¹², se caracterizan por presentar ácidos fenólicos y derivados del ácido dicafeoilquínico, así como flavonoles y sus derivados glicosilados, los cuales poseen una gran capacidad antioxidante.

Finalmente, se hace necesario aislar los compuestos fenólicos en *S. rufescens* DC., y determinar su estructura química para explicar mejor su capacidad antioxidante y realizar otros ensayos relacionados con sus propiedades biológicas.

CONCLUSIONES

En conclusión, reportamos el contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles; y su capacidad antioxidante utilizando los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP del extracto metanólico y de sus fracciones, obtenidas a partir de las hojas de *S. rufescens* DC., resaltando

el alto contenido de compuestos fenólicos y la alta capacidad antioxidante de la fracción metanólica en los modelos ensayados.

AGRADECIMIENTO

Al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por las facilidades para la realización de la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beltrán H, Roque J. El género *Senecio* L. (Asteraceae-Senecioneae) en el departamento de Lima, Perú. *Arnaldoa*. 2015;22(2):395–412.
2. Yang Y, Zhao L, Wang Y-F, Chang M-L, Huo C-H, Gu Y-C, et al. Chemical and pharmacological research on the plants from Genus *Senecio*. *Chem Biodivers*. 2011;8(1):13–72.
3. Alqahtani AS, Herqash RN, Noman OM, Nasr FA, Alyhya N, Anazi SH, et al. *In vitro* antioxidant, cytotoxic activities, and phenolic profile of *Senecio glaucus* from Saudi Arabia. *Evid Based Complement Altern Med*. 2020;9. doi:10.1155/2020/8875430
4. Faraone I, Rai DK, Chiummiento L, Fernandez E, Choudhary A, Prinzo F, et al. Antioxidant activity and phytochemical characterization of *Senecio clivicolus* Wedd. *Molecules*. 2018;23(10):1–17.
5. Singh R, Singh P, Sati N, Sati OP. Antioxidant activity of *Senecio amplexicaulis* Kunth. extracts. *World J Pharm Sci*. 2015;3(3):600–604.
6. Pietrellini F. Las Plantas Medicinales en un piso alto y mesoandino. Estudio etnobotánico en la zona de Puquio (Ayacucho). Huamanga - Perú: Graficenter Perú EIRL; 2007. 491–492 p.
7. Baskar V, Venkatesh R, Ramalingam S. Flavonoids (Antioxidants Systems) in Higher Plants and Their Response to Stresses. In: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ, editors. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Cham (Switzerland): Springer International Publishing AG; 2018. p. 253–268.
8. Soriano M, Bonilla P, Arroyo Acevedo J, Pereyra S. Actividad cicatrizante tópica de los metabolitos secundarios en el extracto etanólico de hojas de *Senecio culcitoides* Weed. *Folia Dermatol Peru*. 2004;15(3):155–159.
9. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal*. 2006;19(6–7):669–675.
10. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 1999;64:555–559.
11. Miliuskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*. 2004;85(2):231–237.

12. Tan D-P, Chou G-X, Wang Z-T. Phenolic compounds from *Senecio scandens*. *Biochem Syst Ecol.* 2010 Feb;38(1):122–124.
13. Shaza M. Phytochemical and Biological Study of *Senecio glaucus* subsp. *coronopifolius* (Maire) C. Alexander Growing in Egypt. *J Pharm Sci.* 2015;52:283–298.
14. Lahlou F, Hmimid F, Loutfi M, Bourhim N. Antioxidant Activity Phenolics Flavonoids and Proanthocyanidins Content of *Senecio anteuphorbium*. *Int J Biochem Res Rev.* 2014;4(6):550–558.
15. Shah P, Modi HA. Comparative Study of DPPH , ABTS and FRAP Assays for Determination of Antioxidant Activity. *Int J Res Appl Sci Eng Technol.* 2015;3(98):636–641.
16. Rodrigues E, Poerner N, Rockenbach II, Gonzaga LV, Mendes CR, Fett R. Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. *Food Sci Technol.* 2011;31(4):911–917.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOESTRUCTURAS TIPO COBRE-SELENIO OBTENIDAS MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE MICROONDAS Y MECANOSÍNTESIS

Aldo Javier Guzmán Duxtan^{*a}, Elvis Mauricio Jiménez Peña^a

RESUMEN

En este trabajo se describe la síntesis de nanoestructuras de seleniuro de cobre, utilizando la técnica de microondas y mecano-síntesis. En la síntesis asistida por microondas, el proceso se realizó en un horno microondas modificado, para ello, a una solución de sulfito de sodio se le añadió selenio en polvo, esta mezcla fue sometida a radiación microondas al 40 % formando así el selenosulfato de sodio para luego agregarle acetato de cobre manteniendo la proporción Cu:Se (1:1) mientras se sometía nuevamente a irradiación, obteniendo al finalizar un precipitado negro de seleniuro de cobre. La otra técnica es la mecano-síntesis, donde se molió polvos de cobre y selenio bajo atmósfera inerte, utilizando un molino SPEX 8000M, obteniendo seleniuro de cobre. Los productos fueron caracterizados mediante DR-X, FRX-ED, MEB, EDX, UV-Vis. Los resultados indican que se formaron las fases Cu₂Se, Cu₃Se₂ y Cu_{1.8}Se. Empleando las ecuaciones de Scherrer y Williamson-Hall se determinó el diámetro promedio del cristalito entre 8 y 83 nm, y con la ayuda del programa OriginPro 2017, se calcularon las microtensiones que estuvieron entre 0.00105 a 0.01031 Pa. La banda de energía prohibida se obtuvo empleando el ploteo de Tauc, obteniendo valores entre 1 y 2 eV.

Palabras clave: Selenio, microondas, mecano-síntesis, seleniuro de cobre.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF COPPER-SELENIO TYPE NANOSTRUCTURES OBTAINED THROUGH MICROWAVE AND MECHANOSYNTHESIS TECHNIQUES

ABSTRACT

In this work, the synthesis of copper selenide nanostructures is described, using the microwave and mecano-synthesis technique. In microwave-assisted synthesis, the process was carried out in a modified microwave oven. To this a solution of sodium sulfite was added with selenium powder, this mixture was subjected to microwave radiation at 40 %, thus forming sodium selenosulphate for then add copper acetate maintaining the Cu: Se ratio

^a Facultad de Química e Ing. Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Calle German Amezaga 375, Ciudad Universitaria, Lima, Perú.

* aldo.guzman@unmsm.edu.pe

(1: 1) while undergoing irradiation again, obtaining at the end a black precipitate of copper selenide. The other technique is mecnanosynthesis, where copper and selenium powders were ground under inert atmosphere, using a SPEX 8000M mill, obtaining copper selenide. The products were characterized by DR-X, FRX-ED, MEB, EDX, UV-Vis. The results indicate that the Cu_2Se , Cu_3Se_2 and $\text{Cu}_{1.8}\text{Se}$ phases were formed. Using the equations of Scherrer and Williamson-Hall, the average diameter of the crystallite was determined between 8 and 83 nm, and with the help of the OriginPro 2017 program, microtensions that were between 0.00105 to 0.01031 Pa were calculated. The banned energy band was obtained using the plot of Tauc, obtaining values between 1 and 2 eV.

Key words: microwave, mecnanosynthesis, copper, selenium.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las nanoestructuras de seleniuro de cobre han tenido un alto interés dado que el seleniuro de cobre posee propiedades fascinantes y por ello amplias aplicaciones en campo tecnológico como: convertidores termoelectrónicos¹, filtros ópticos², dispositivos fotoelectrónicos de alta eficiencia³, superconductores iónicos⁴, sensores de gases⁵, células solares⁶ y fotocatalizadores⁷ que permiten degradar productos químicos peligrosos. Es por eso que se vienen utilizando e implementando métodos para su síntesis como el solvotermal⁸, irradiación gamma⁹, sonoquímico¹⁰, electrodeposición¹¹, evaporación al vacío¹², coloidal¹³, deposición de baño químico¹⁴, deposición química de vapor¹⁵ y deposición por láser pulsado¹⁶. El seleniuro de cobre es un semiconductor compuesto extrínseco tipo p, existe en diferentes composiciones estequiométricas¹⁷ (CuSe , Cu_2Se , Cu_3Se_2 , CuSe_2 , Cu_3Se_4) y no estequiométricas¹⁸ (Cu_{2-x}Se). Este material es potencialmente alternativo para sustituir al silicio en dispositivos electrónicos y particularmente en células solares por poseer una banda de energía prohibida entre 1 y 2.3 eV¹⁹. En nuestros laboratorios empleamos dos métodos asequibles para la obtención de las nanoestructuras tipo cobre-selenio, por microondas que representa una técnica alternativa que proporciona la energía térmica a un proceso fisicoquímico ventajas comparativas como el ahorro de tiempo, energía, rapidez y eficiencia que serían difíciles de conseguir por otros métodos convencionales²⁰. Además, esta es una técnica amigable con el medio ambiente y una alternativa que apoya el desarrollo de nuevas líneas de investigación. Por otra parte, tenemos la mecnanosíntesis²¹ o molienda mecánica, que es considerada una técnica moderna, útil y versátil, ha permitido producir materiales en fases fuera del equilibrio termodinámico (sin la necesidad de recurrir a solventes químicos nocivos que perjudican el medio ambiente), tales como: aleaciones, soluciones sólidas extendidas y/o amorfas, fases nanovítreas y cuasicristales. Las nanoestructuras preparadas de seleniuro de cobre, luego, se caracterizaron por determinación de sus fases estructurales, composición química y morfología. Además, sus propiedades ópticas se analizaron mediante espectroscopia UV-Vis y para determinar la banda de energía prohibida se utilizó el ploteo de Tauc²².

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis de nanoestructuras tipo Cu-Se por vía microondas

Para este experimento, se utilizó la proporción de masas Cu:Se=1:1 (CuSe (A)). Primero, en un vaso de precipitado, se preparó selenosulfato de sodio (Na_2SeSO_3), disolviendo 0.263 g de selenio (0.0033 mol) en polvo con 50 mL de una solución de sulfito de sodio 1,1 M. La mezcla resultante de color negro con un $\text{pH} \approx 9$ se homogenizó durante 10 minutos y se vertió en un balón de 250 mL. Seguidamente, se colocó el balón en el horno de microondas (figura1) y se irradió con una potencia de 40 % durante dos intervalos de 15 minutos con reflujo y agitación. Al transcurrir el tiempo se observó que la solución se tornó transparente, por otro lado, se disolvió 0.751 g de acetato de cobre (0.0041 mol de cobre) en 50 mL de agua destilada. Nuevamente, se continuó la irradiación microondas a la solución transparente bajo las mismas condiciones (potencia: 40 %, por 15 minutos) y en ese intervalo de tiempo de le adicionó la solución de acetato de cobre de manera continua mediante un embudo Schlenk, continuando con la irradiación por otros 15 minutos, se logró ver la formación de un precipitado de color negro en el interior del balón.



Figura 1. Microondas modificado.

Por último, el precipitado, se filtró en un matraz erlenmeyer utilizando papel filtro y lavándolo con agua destilada caliente y etanol absoluto, para luego llevar a la estufa para secado por 2 horas a una temperatura de 80°C durante 20 minutos. A esta única muestra se le hizo posteriormente tratamiento térmico colocando solo el producto sin el papel filtro en un crisol que se llevó a una mufla y se calentó aproximadamente 2 horas a 800°C . Controlar la formación de las fases de seleniuro de cobre es complicado porque tienden a formarse varias durante el proceso de síntesis por eso se realizaron otras dos experiencias con proporciones numéricas sencillas para analizarlas y quedarse con aquella donde se obtenga la fase pura. Las otras dos muestras sintetizadas empleando esta técnica fueron las Cu:Se=2:1 y Cu:Se=3:2, denominadas CuSe (B) y CuSe (C), respectivamente, manteniendo fija la potencia de irradiación y el tiempo, pero variando la cantidad de agente reductor.

Síntesis de nanoestructuras tipo Cu-Se por mecano-síntesis

La síntesis comienza con el cálculo de las masas de cada elemento que forma parte del sistema Cu-Se, manteniendo la estequiometría Cu:Se=2:1. Para la nanoestructura Cu₂Se se tiene:

$$m_{Se} = (38.32\%) * masa_{total} \quad (1)$$

$$m_{Cu} = (61.68\%) * masa_{total} \quad (2)$$

La masa total se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{villas}{carga} = \frac{masa_{totaldebolos}}{masa_{total}} \quad (3)$$

En este trabajo la relación villas/carga²³ empleada fue de 10:1, el peso de cuatro villas de acero fue de 33.1474 gramos, luego reemplazando en la ecuación 3:

$$\frac{10}{1} = \frac{33.1474}{masa_{total}}$$

$$masa_{total} = 3.3147g \quad (4)$$

Reemplazando este valor en las ecuaciones 1 y 2 se obtiene:

$$m_{Se} = (38.32\%) * 3.3147 = 1.2702g$$

$$m_{Cu} = (61.68\%) * 3.3147 = 2.0445g$$

Teniendo todas las masas pesadas, se procedió a trabajar en una cámara de vacío (0,05 bar) saturada de gas argón; en estas condiciones, se adicionan los polvos y las villas en un contenedor cilíndrico de base plana para posterior sellado, este contenedor es propio del Molino Vibratorio (SPEX, 8000M) que se observa en la figura 2. El contenedor se instaló en el brazo mecánico del molino y se trabajó en intervalos de molienda de 30 minutos con 10 minutos de pausa entre cada molienda. Para un tiempo neto de molienda de 12 horas se tomaron pequeñas muestras bajo condiciones de atmósfera inerte en la cámara ya mencionada, los intervalos de tiempo fueron de 0 (blanco), 1, 3, 6 y 12 horas para evaluar el desarrollo de dicha molienda. No se prepararon y molieron muestras con la relación Cu:Se = 1:1 y Cu:Se = 3:2, debido a la indisponibilidad del equipo de molienda que era empleado en muchos trabajos de investigación en la facultad de física.



Figura 2. a) Molino de sistema vibratorio modelo SPEX 8000M; b) Motor y brazo mecánico; c) cámara de guantes; d) Cilindros para gases inertes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización estructural, estudio de fases y determinación de tamaño de partícula

Los siguientes difractogramas resultan de la formación de muestras mediante la técnica microondas. En la figura 3 se observa el difractograma de la muestra CuSe(A) y las distintas fases del seleniuro de cobre formado cuando se mantuvo la relación Cu:Se=1:1, la primera corresponde a la fase Cu_3Se_2 ($P\bar{4}21m$) tetragonal tipo umangita (239-ICSD) que presenta picos de difracción con mayor intensidad en ángulos $2\theta=25.05, 27.87, 28.74, 39.65, 49.89$ y $51,52^\circ$ que tienen por planos cristalinos (101), (200), (111), (220), (311), (202). La segunda fase Cu_2Se ($F\bar{3}m$) cúbica tipo berzelianita (33628-ICSD) muestra picos con alta intensidad en $2\theta=26.96$ y 44.79° con planos correspondientes a (111) y (220).

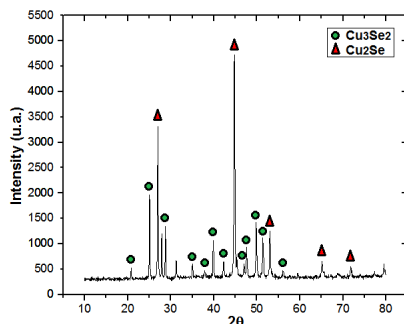


Figura 3. Difractograma de Rayos X de la muestra CuSe(A).

El difractograma de la figura 4 pertenece al espectro de la muestra CuSe (B) y presenta la mezcla de dos fases, en la cual, a diferencia de la primera muestra sintetizada se realizó un cambio en la relación cobre/selenio a Cu:Se=2:1. La fase $\text{Cu}_{1.8}\text{Se}$ ($F\bar{4}3m$) cúbica tipo berzelianita (77376-ICSD) posee picos de difracción característicos en los ángulos $2\theta=26.93$, 44.74 y 52.24° dados por los planos cristalinos (111), (220) y (331). El difractograma revela también la coexistencia de la fase Cu_3Se_2 ($P\bar{4}21m$) tetragonal tipo umangita (33628-ICSD), donde se puede observar que los picos de esta fase presentan menores intensidades en comparación a lo mostrado en la figura 3.

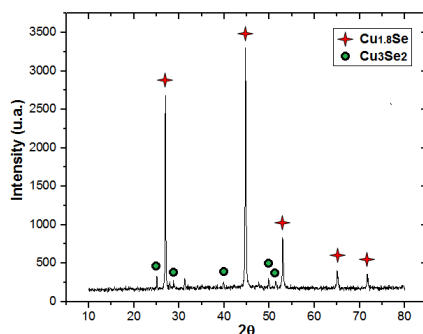


Figura 4. Difractograma de rayos X de la muestra CuSe (B).

En la figura 5, se observa el difractograma de la muestra CuSe (C), en la cual se volvió a cambiar la relación a Cu:Se=3:2. Este difractograma indica la presencia de una sola fase pura, identificada como $\text{Cu}_{1.8}\text{Se}$ ($F\bar{4}3m$) cúbica tipo berzelianita (77376-ICSD), la cual presenta picos con intensidades fuertes que aparecen en los ángulos $2\theta=26.93$, 44.63 y 52.88° correspondientes a los planos cristalinos (111), (200) y (220). Además, no aparece la fase Cu_3Se_2 que se presentaba en los anteriores difractogramas, por lo tanto, la nanoestructura $\text{Cu}_{1.8}\text{Se}$ posee una mayor pureza.

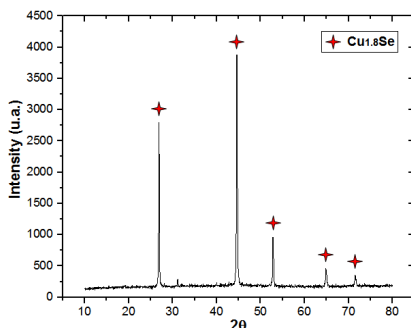


Figura 5. Difractograma de Rayos X de la muestra CuSe (C).

Es conocido que los seleniuros de cobre poseen diferentes estados polimórficos¹¹ al incrementar la temperatura, es por ello que se realizó tratamiento térmico a la primera muestra sintetizada CuSe (A) cuyo difractograma se aprecia en la figura 3, la cual presenta las fases Cu_3Se_2 y Cu_2Se . El resultado del calentamiento se observa en el difractograma de la figura 6, donde ambas fases desaparecieron dejando solo la señal del óxido de cobre (CuO), es muy probable que la fase Cu_2Se haya sufrido la transformación polimórfica a $150\text{ }^\circ\text{C}$ y que haya ocurrido la ruptura del Cu_3Se_2 en Cu_{2-x}Se y CuSe . Sin embargo, al calentar se sobrepasa el punto de ebullición del selenio ($684,8\text{ }^\circ\text{C}$) produciendo el desprendimiento rápido del selenio gaseoso quedando en la muestra el cobre que reacciona con el oxígeno produciendo CuO . Al observar este resultado no se hizo el mismo tratamiento con las demás muestras de seleniuro de cobre porque nuevamente se daría el desprendimiento de todo el selenio en forma de gas quedándose solo el óxido de cobre.

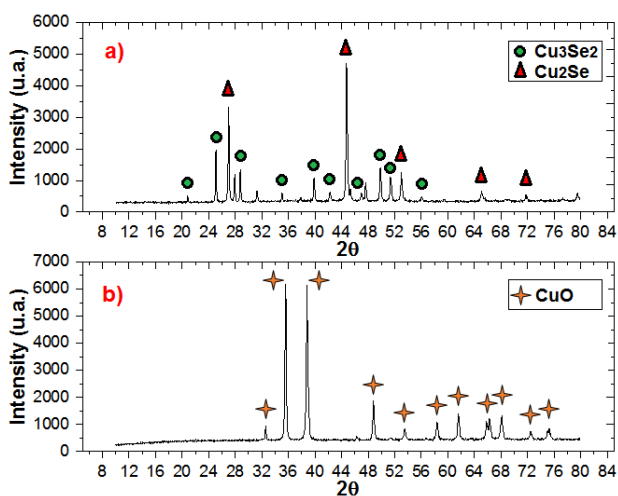
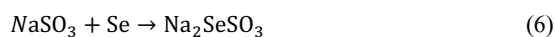
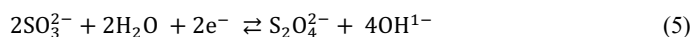


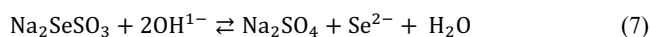
Figura 6. a) Difractograma de rayos X de la muestra CuSe(A) antes del tratamiento térmico;
b) Difractograma de rayos X después de 2 horas a $800\text{ }^\circ\text{C}$.

Es evidente a partir de los difractogramas de rayos X anteriores la importancia de la proporción Cu/Se usada en cada experimento para la formación de las distintas fases de seleniuro de cobre. Esto ocurre en el medio de reacción que contiene iones de cobre y selenio con diferentes potenciales de reducción, el ion selenio tiene un mayor potencial de reducción por lo tanto este agente reductor pierde sus electrones volviéndose Se^0 estas partículas iniciales se forman y comienzan a crecer, a su vez los iones cobre ganan los electrones y se vuelven Cu^0 los cuales quedan atrapados e incluidos en los espacios tetraédricos u octaédricos de la red cristalina del selenio formándose así las diferentes fases de la nanoestructura. Para explicar mejor la formación de las dos fases presentes en el difractograma (figura 3) de la muestra CuSe (A), se parte del siguiente mecanismo de reacción:

La reacción al agregar un exceso de sulfito de sodio (agente reductor) y selenio, tal como se indica cuando se emplea la técnica por microondas, da paso a un medio básico donde ocurre la hidrólisis del sulfito de sodio y la formación del selenosulfato (Na_2SeSO_3), reacciones 5 y 6:



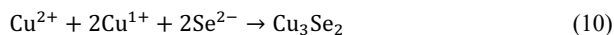
El selenosulfato de sodio es la fuente de iones Se^{2-} , este compuesto es inestable en medio básico y se disocia como ocurre en la siguiente reacción:



Al agregar acetato de cobre al medio de reacción parte de los iones cobre Cu^{2+} son reducidos hasta Cu^{1+} por el agente reductor sulfito como se da en la reacción 8, para luego reaccionar con los iones seleniuro originados en la reacción 7 que conducen a la formación del Cu_2Se , que se muestra en la reacción 9:



En la solución también ocurre que los iones Cu^{2+} y Cu^{1+} reaccionan con los iones seleniuro para producir la fase Cu_3Se_2 como se indica en:



Ambas fases formadas en la muestra CuSe (A) tienen porcentajes en pesos similares como se indica en la tabla 2, por lo tanto se puede afirmar que hay una proporción similar de iones Cu^{2+} y Cu^{1+} durante la síntesis. En el difractograma de la muestra CuSe (B) mostrado en la figura 4, se aprecia que las intensidades de los picos característicos de la fase Cu_3Se_2 disminuyen drásticamente y se pierde la estequiometría Cu_2Se dando lugar a la fase no estequiométrica $\text{Cu}_{1.8}\text{Se}$ que presenta una mayor intensidad. La formación de la fase no estequiométrica ocurre al cambiar las condiciones iniciales que permitían la existencia de la fase Cu_2Se en la muestra CuSe (A), como reducir a la mitad el número de moles de selenio y sulfito de sodio utilizados durante el experimento con la muestra CuSe (B) donde se empleó la relación $\text{Cu}:\text{Se}=2:1$ (tabla 1). La consecuencia directa es disminuir la concentración del selenosulfato de sodio formado tal como se indica en la reacción 6, además ocurre una variación del pH haciendo al medio menos básico en comparación al anterior experimento, ambos efectos producen un desplazamiento a la izquierda en la reacción 7 disminuyendo así la concentración de iones seleniuro provocando que la reacción 10 esté desfavorecida ya que esa reacción necesita más iones seleniuros ocasionando así la disminución de la fase Cu_3Se_2 . A diferencia de los experimentos anteriores en la muestra CuSe (C) desapareció por completo la fase Cu_3Se_2 formándose solo la fase pura $\text{Cu}_{1.8}\text{Se}$ en el difractograma de rayos X de la figura 5, esto ocurre porque se redujo la cantidad de moles de cobre utilizadas (tabla 1) al

emplear la relación Cu:Se=3:2, facilitando la acción del exceso de sulfito en reducir todos los iones Cu^{2+} a Cu^{1+} y desfavoreciendo por completo la reacción 10. Los porcentajes en pesos de la tabla 2, una vez más corroboran lo anterior puesto que el porcentaje en peso de la fase Cu_3Se_2 disminuye hasta el 17 % en la muestra CuSe (B), mientras que en la muestra CuSe (C) desaparece dejando solo la fase $\text{Cu}_{1,8}\text{Se}$ al 100 %.

Tabla 1. Cantidad de reactivos utilizados al inicio de la síntesis.

Muestra	Relación	cobre (mol)	selenio (mol)	Sulfito de sodio (mol)
CuSe (A)	1:1	0.0041	0.0033	0.0550
CuSe (B)	2:1	0.0041	0.0016	0.0275
CuSe (C)	3:2	0.0031	0.0016	0.0275

Por otra parte, todos los procesos de molienda comprenden tres principales etapas que se dieron bajo atmósfera inerte para evitar que ingrese el oxígeno y se formen óxidos, los cuales son fases impuras no deseadas que aparecen frecuentemente durante la mecano-síntesis. En la etapa inicial, los polvos elementales de cobre y selenio son aplanados y forman estructuras laminares, las superficies creadas recientemente durante la fractura permiten que las partículas se junten y suelden en condiciones frías. En la etapa intermedia de la molienda los seguidos impactos de las bolas contra los polvos elementales incrementa el número de defectos, deslocalizaciones, vacantes, límites de granos. La presencia de estos defectos estructurales permite la difusión ultrarrápida, así como también la formación del seleniuro de cobre. Finalmente, en la última etapa, la composición final del Cu_2Se formado se aproxima a la proporción de polvos elementales de Cu y Se usadas al inicio la cual se mantuvo en la relación Cu:Se=2:1. La serie de difractogramas en la figura 7 pertenecen a la mezcla de polvos elementales que fueron molidos y posteriormente monitoreados durante diferentes intervalos de tiempo (horas) en el proceso de mecano-síntesis. A las 0 h corresponde a la mezcla de partida, por lo tanto solo aparecen las intensidades propias del cobre con estructura cúbica centrada en la cara y selenio con estructura hexagonal.

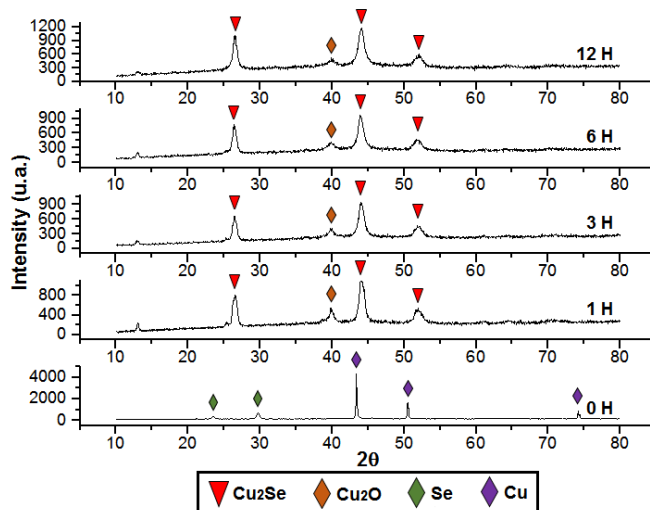


Figura 7. Difractogramas de Rayos X de las nanoestructuras de seleniuro de cobre obtenidas por mecano-síntesis.

Después de 1 h de molienda se puede observar la desaparición de las intensidades de los picos iniciales que evidencian la desaparición de los planos cristalográficos del Cu y Se para dar lugar a la formación de una nueva fase correspondiente a Cu_2Se ($F23$) cúbica tipo berzelianita (JCPDS card 76-0136) que se formó por el continuo impacto de las bolas contra los polvos elementales iniciales, también se produjo óxido de cobre (Cu_2O) probablemente al entrar la muestra en contacto con el aire cuando se realizaron las mediciones en el equipo de DR-X. Durante los siguientes intervalos de tiempo predominó la existencia de la fase Cu_2Se , se observó que en los espectros analizados cada vez se iban incrementando las intensidades que se relaciona con el grado de cristalinidad y el ancho de pico relacionado con la reducción de tamaño de partícula, los picos característicos se localizaron los ángulos $2\theta=26.54, 44.03, 52.15^\circ$ que tienen como coordenadas a los planos cristalinos (111), (220) y (311), respectivamente.

A partir de los difractogramas de rayos X se realizaron refinamientos por el método Rietveld^{14,15}, con la finalidad principal de calcular el porcentaje de todas las fases de seleniuro de cobre presente en cada difractograma mostrado anteriormente. En concreto, se identificaron primero las fases presentes en cada difractograma utilizando el software Crystallographica Search-Match 2.1, luego se buscó la data (archivo) de estas fases en una base de datos cristalográficos y junto a los datos experimentales obtenidos, son estudiados en el software especializado MAUD v2.33 para refinar los difractogramas de las figuras 3, 4, 5 y 7, con el fin de obtener el porcentaje de fases, parámetros de red entre otros. Las figuras 8, 9 y 10 pertenecen a los refinamientos realizados en los difractogramas de las muestras sintetizadas mediante la técnica microondas, mientras que, la figura 11 es el difractograma

refinado de la muestra molida por 12 horas durante la mecanosíntesis. Adicionalmente, los principales parámetros obtenidos aplicando el refinamiento Rietveld son mostrados en la tabla 2.

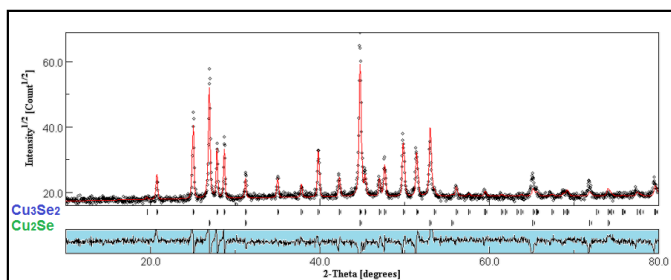


Figura 8. Difractograma de Rayos X con refinamiento de la muestra CuSe (A).

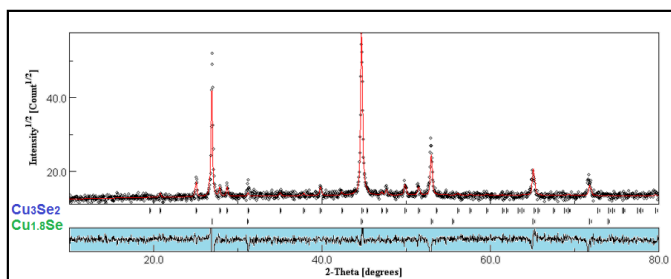


Figura 9. Difractograma de Rayos X con refinamiento de la muestra CuSe(B).

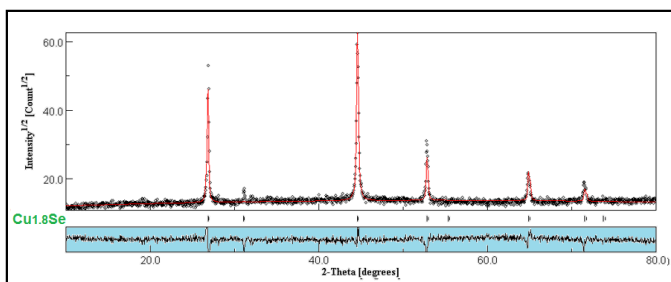


Figura 10. Difractograma de Rayos X con refinamiento de la muestra CuSe (C).

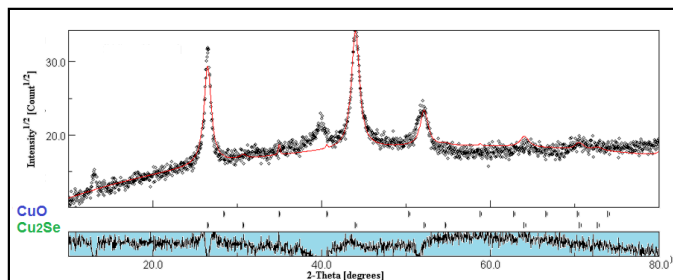


Figura 11. Difractograma de Rayos X y refinamiento de la fase Cu_2Se obtenida por mecano-síntesis a las 12 horas.

Tabla 2. Parámetros obtenidos en el refinamiento de Rietveld de las muestras sintetizadas por las técnicas microondas y mecano-síntesis.

Muestra	Fase	Parámetros de red (Å)	Volumen de celda (Å ³)	% Fases
CuSe (A)	Cu_2Se	$a=b=c=5.720$	187.149	52.996
	Cu_3Se_2	$a=b=6.394$ $c=4.267$	174.449	47.004
CuSe (B)	Cu_3Se_2	$a=b=6.395$ $c=4.261$	174.258	17.062
	$\text{Cu}_{1.8}\text{Se}$	$a=b=c=5.7261$	187.739	82.938
CuSe (C)	$\text{Cu}_{1.8}\text{Se}$	$a=b=c=5.740$	189.119	100
Cu_2Se	Cu_2Se	$a=b=c=5.812$	196.32	80.323
	Cu_2O	$a=b=c=4.482$	90.034	10.667

El diámetro promedio del cristalito (D) y la tensión de la nanoestructura (ϵ) de las nanoestructuras se calcularon mediante las ecuaciones de Williamson-Hall¹⁷ y Scherrer¹⁸. El procedimiento del cálculo parte con los difractogramas ya refinados de las muestras sintetizadas, la data de estos difractogramas se exporta mediante el software MAUD, hacia el programa OriginPro 2017 b9.4.0.220 en donde se separaron las fases que podrían estar presentes en el difractograma. Al tratar este difractograma refinado (figura 3) de la muestra CuSe (A) se logra separar las fases tal como se muestra en la figura 12.

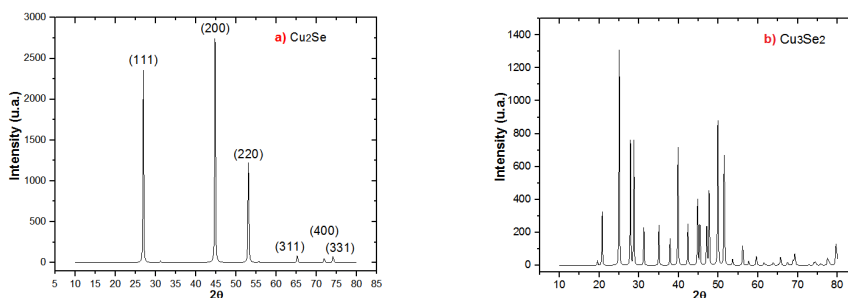


Figura 12. Difractogramas de Rayos X separados de la fase Cu_2Se (a) y de la fase Cu_3Se_2 en (b).

A partir del difractograma figura 12 (a) se ajusta el pico (111) para un análisis deconvolutivo al perfil de la función de ajuste PsdVoigt1 para obtener los parámetros X_c y W , tal como se muestran en la figura 13.

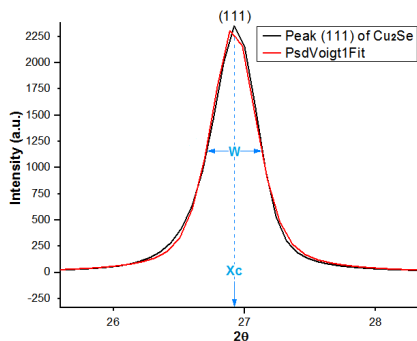


Figura 13. Ajustes de picos de la fase Cu_2Se perteneciente al plano (111).

Luego se registran los valores paramétricos del pico en la tabla 3, siendo W (también denominado β o FWHM) la anchura del pico a altura media del mismo y X_c el ángulo de difracción 2θ .

Tabla 3. Datos del pico (111) de la fase Cu_2Se .

Función		PsdVoigt1	
	Parámetro	Valor	Error estándar
Plano (111)	Y_0	-3.0955	2.41503
	X_c	26.95876	0.001
	A	658.312	7.16997
	W (°)	0.20925	0.00236
	μ	0.63513	0.02827
Chi^2		462.472446	
R^2		0.99725	

Convirtiendo y reemplazando los valores de X_c (13.47938°) y W ($0.20925^\circ = 0.00365211$ rad) en la ecuación de Williamson-Hall:

$$\beta_{hkl} \cos \theta = \frac{k\lambda}{D} + 4\epsilon \sin \theta \quad (11)$$

$$(0.00365211) \cdot \cos(13.47938) = \frac{(0.9)(0.1546)}{D} + (4) \cdot (\epsilon) \cdot \sin(13.47938)$$

El mismo procedimiento se aplica a los demás picos de la figura 12 (a), dando otras cinco ecuaciones análogas a la anterior y correspondientes a los planos (200), (220), (311), (400) y (331). Las ecuaciones se utilizaron para plotear el gráfico de la figura 14, luego se ajustó los puntos a una ecuación lineal para obtener los valores del intercepto y pendiente.

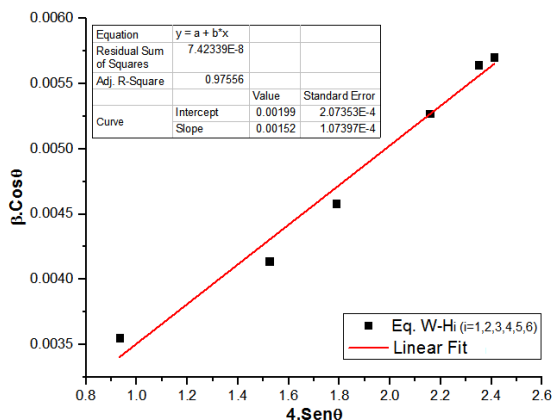


Figura 14. Ploteo Williamson-Hall de la fase Cu_2Se .

La ecuación de la recta resultante se expresa como:

Fase	(hkl)	2Θ (°)	β (rad)	$B*\cos(\Theta)$	$4*sen(\Theta)$	$Y =$
0.00199 +	210	20.77532	0.00330	0.00325	0.72123	
	101	25.0542	0.00327	0.00319	0.86761	
	200	27.87298	0.00332	0.00322	0.96338	
	111	28.73706	0.00338	0.00328	0.99263	
	210	31.25084	0.00340	0.00328	1.07739	
	201	35.04784	0.00360	0.00344	1.20442	
Cu_3Se_2	211	37.85352	0.00377	0.00356	1.29744	
	220	39.85598	0.00389	0.00365	1.36336	
	200	42.35128	0.00405	0.00378	1.44491	
	111	44.8093	0.00415	0.00383	1.52458	
	210	45.37992	0.00433	0.00399	1.54298	
	201	47.09582	0.00459	0.00421	1.59806	
0.00152(X)	211	47.67942	0.00436	0.00398	1.61672	
	220	49.89848	0.00462	0.00419	1.68726	
	111	51.49134	0.00478	0.00430	1.73751	

(12)

Relacionando los términos de las ecuaciones 11 y 12 se tiene:

$$\frac{K\lambda}{D} = 0.00199$$

$$\frac{(0.9 * 0.1546nm)}{D} = 0.00199$$

$$D = 69.92nm \quad (13)$$

$$\varepsilon = 0.00152 \quad (14)$$

Para el caso de la fase Cu_3Se_2 presente en 12 (b) se empleó el mismo procedimiento ajustando los picos y registrando los valores de 2θ y β en la tabla 4. Estos datos son empleados para plotear el gráfico de la figura 15, obteniendo un $D=64.79$ nm y $\varepsilon=0.00117$.

Tabla 4. Datos de los picos de la fase Cu_3Se_2 .

Función	Parámetro	PsdVoigt1	
		Valor	Error estándar
Plano (111)	Y_0	-3.0955	2.41503
	X_c	26.95876	0.001
	A	658.312	7.16997
	W (°)	0.20925	0.00236
	μ	0.63513	0.02827
Chi ²		462.47244	
		6	
R ²		0.99725	

Convirtiendo y reemplazando los valores de X_c (13.47938°) y W (0.20925°=0.00365211 rad) en la ecuación de Williamson-Hall:

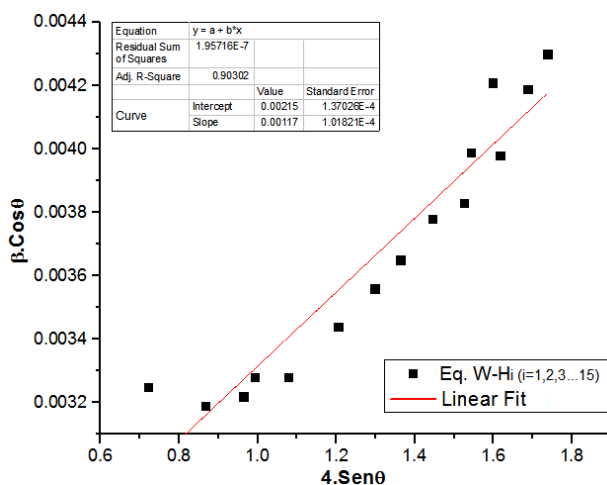


Figura 15. Ploteo Williamson-Hall de la fase Cu_3Se_2 .

El tamaño del cristalito y la tensión de la nanoestructura Cu₂Se preparada por mecano-síntesis se realizó también por deconvolución, ajustando con la función PsdVoigt1 al pico correspondiente al plano (220) de mayor intensidad presente en los difractogramas de las muestras molidas a 1, 3, 6 y 12 horas mostrados en la figura 7. La figura 16 muestra el ajuste del mencionado pico perteneciente a la muestra molida durante la primera hora, mientras la tabla 5 presenta los valores respectivos de los parámetros obtenidos.

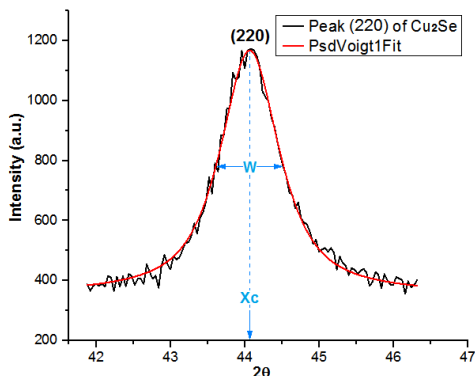


Figura 16. Ajuste del pico (220) a 1 hora de molienda.

Tabla 5. Datos del pico (220).

Función	PsdVoigt1		
	Parámetro	Valor	Error estándar
Plano (220)	Y ₀	356.76795	27.8568
	X _c	44.14103	0.00636
	A	596.02138	119.38411
	W	0.83867	0.01909
	mu	-0.51872	0.53032
Chi ²		1309.04184	
R ²		0.98386	

Los datos de la tabla 5 se emplearon en la ecuación de Scherrer:

$$D = \frac{0.9 \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \tag{15}$$

$$D = \frac{0.9 \cdot 0.15406}{0.01463758 \cdot \cos(22.070515)}$$

$$D = 9.7 \text{ nm} \tag{16}$$

Además, la tensión en la nanoestructura se calcula mediante:

$$\beta = 4\epsilon \tan\theta \quad (17)$$

$$0.01463758 = 4\epsilon \tan(22.070515)$$

$$\epsilon = 0.00902 \quad (18)$$

Por lo tanto, el diámetro promedio del cristalito calculado a la primera hora de molienda fue de 9.7 nm y la tensión de la nanoestructura 0.00902, el mismo método se emplea en los demás difractogramas a las 3, 6 y 12 horas registrando los datos en la tabla 6. Una forma de observar la evolución del tamaño de cristalito y la tensión entre las partículas durante cada intervalo de tiempo es utilizar los datos de la tabla 6 para realizar el gráfico mostrado en la figura 17 donde se aprecia que al término de las 12 horas de molienda mecánica, las microtensiones de las nanoestructuras se incrementan conforme el tamaño del cristalito de la nanoestructura formada decrece hasta los 8.5 nm.

Tabla 6. Parámetros de las muestras molidas a 1,3, 6 y 12 horas.

Mecanosíntesis	(hkl)	Tiempo (h)	Θ (°)	β (rad)	ϵ	D (nm)
Cu ₂ Se	220	1	22.0705	0.0146375	0.00902	9.7
		3	22.0361	0.0158980	0.00982	8.9
		6	21.9995	0.0155771	0.00964	9.2
		12	22.0336	0.0166859	0.01031	8.5

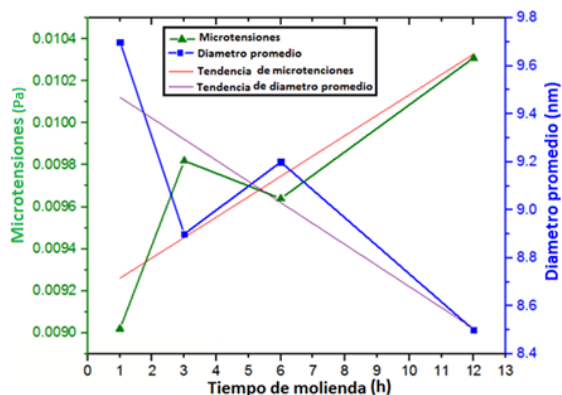


Figura 17. Evolución del tamaño del cristalito y microtensión de las muestras molidas a 1, 3, 6 y 12 horas.

Estudio de la morfología y composición química de las muestras

La figura 18 pertenece a la MEB de la muestra producida por mecano-síntesis después de 12 horas de molienda. La imagen a 300X en (a) presenta una vista general de la muestra, la cual presenta fragmentos de diversos tamaños debido al continuo impacto ocurrido entre las

villas y las partículas de polvo que son sometidas a procesos repetitivos de deformación, fractura y soldadura. Al aumentar la resolución a 1600 y 2400X en (b) y (c) se observa mayor separación de las partículas por el acercamiento al tomar las imágenes, también se observa con claridad la variedad de tamaños de los fragmentos y sus defectos superficiales, los cuales son generadores de superficies químicamente muy activas. Las grietas y fracturas evidencian los efectos de la molienda mecánica de alta energía, estas imperfecciones se aprecian mejor cuando se realiza un aumento de 3000X en (d).

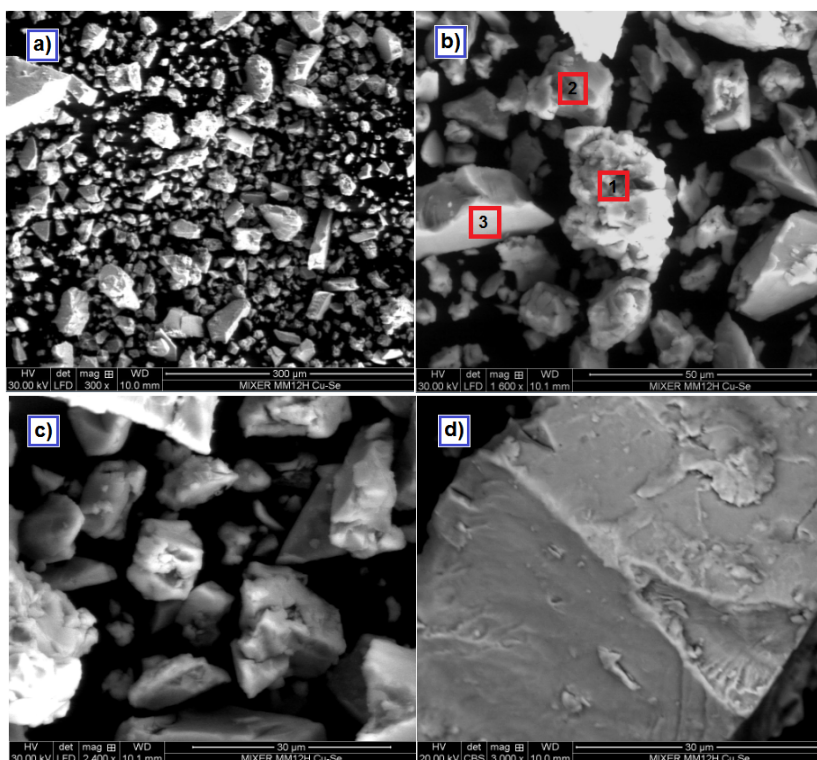


Figura 18. Imagen MEB de las nanoestructuras Cu₂Se producidas por mecano-síntesis a diferentes magnificaciones a) 300X; b) 1600X; c) 2400X; d) 3000X.

La composición elemental de la muestra se realizó mediante el análisis EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) en la zona 1 de la figura 18 (b) y se observa en la figura 19, la tabla 7 muestra la composición química puntual. Los porcentajes atómicos mantienen aproximadamente la relación 2:1, valor que concuerda con la proporción Cu:Se=2:1 utilizada durante todo el proceso de molienda.

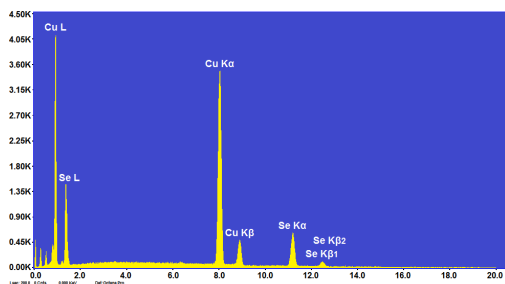


Figura 19. Difractograma EDS de la zona 1 del MEB Cu_2Se .

Tabla 7. Datos espectrales del EDS de la muestra Cu_2Se .

Elemento	Peso%	Atómico%	Error%	K	Z
Cu K	62.04	67.00	0.43	0.6647	1.0274
Se K	37.96	33.00	1.45	0.3376	0.9529

Las imágenes MEB que se observan en la figura 20 pertenecen a la muestra CuSe (B) sintetizada mediante la técnica microondas. La imagen con un aumento de 300X en (a) muestra en la superficie la formación de aglomerados de diferentes tamaños señalados en las zonas 1, 2, 3 y 4. Ellos son originados por la interacción de las nanopartículas que se forman durante la etapa de crecimiento debido a la gran energía superficial y proximidad que presentan. La siguiente imagen (b) aumentada 2400 X de la partícula señalada en la zona 3, muestra cómo las pequeñas formaciones esféricas se fueron aglomerando alrededor a ella.

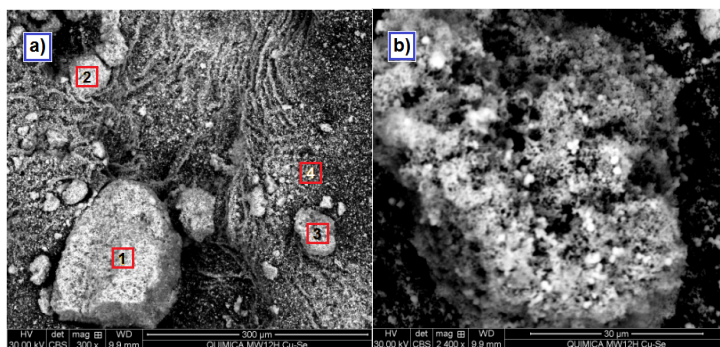


Figura 20. Imagen MEB de la muestra CuSe (B) a dos aumentos a) 300X; b) 2400X.

Un aumento de 2400 X sobre la zona 4 de la figura 20 (a) se aprecia en la figura 21, donde se aprecia mejor cómo las partículas se encuentran dispersas en la superficie y siguen la tendencia de aglomerarse, este efecto impide que en la superficie predominen partículas de formas esféricas como las señaladas en la misma figura con zonas circulares de color rojo. Las imágenes mostradas con sus respectivas resoluciones son las máximas que se pudieron alcanzar empleando el microscopio electrónico de barrido FEI Quanta – 650, la única forma de encontrar algunas posibles imperfecciones y defectos superficiales es empleando la microscopía electrónica de transmisión (TEM) lo cual no se hace en el país, esta es una herramienta mucho más poderosa capaz de analizar a alta resolución a nivel nano, para medir el tamaño de nano partículas, medición del tamaño de grano, tamaño de cristalito, disposición atómica en el material.

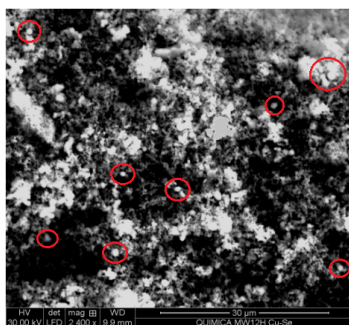


Figura 21. Imagen MEB de la muestra CuSe (B) sobre la zona 4 a 2400X.

Estudio de la energía de banda prohibida

La energía de banda prohibida directa del seleniuro de cobre se determinó indirectamente empleando el análisis UV-Vis en la muestra CuSe (C), sintetizada mediante la técnica de microondas donde se obtuvo solamente la fase $\text{Cu}_{1.8}\text{Se}$. Se preparó una serie de dispersiones a diferentes concentraciones, luego de realizar las lecturas a todas las muestras estas presentaron una banda de absorción característica entre 450 y 550 nm como se observa en la figura 22.

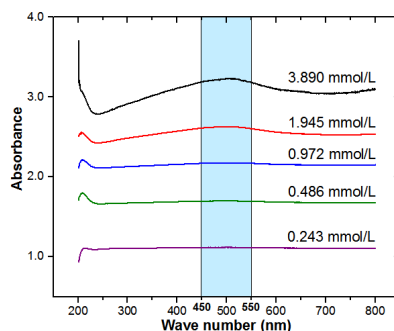


Figura 22. Imagen MEB de la muestra CuSe (B) sobre la zona 4 a 2400X.

Cuando se realizó la medida de la absorbancia a la dispersión cuya concentración fue de 0.243 mmol/L, apareció una banda característica de absorción con una señal más débil del semiconductor aproximadamente a 260 nm, la cual se visualiza al graficar el espectro de absorción que se muestra en la figura 23.

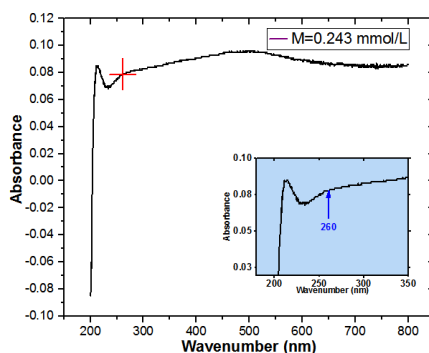


Figura 23. Espectro UV-Vis de la dispersión a 0.243mol/L.

Los valores de las absorbancias obtenidas con sus respectivas longitudes de ondas del espectro UV-vis presentes en la figura 23, se trasladan a hojas de cálculo y se emplean para realizar el ploteo de Tauc, graficando $(A_0 \cdot E)^2$ vs (E_g) tal como se presenta en la figura 24. Además, en la misma figura se traza una línea recta que pasa por la mayor cantidad de puntos de la gráfica, con la finalidad de ajustar los datos experimentales a la recta que intercepta a la abscisa por lo tanto “Y” se hace cero y “X” proporciona el valor aproximado de E_g de 1.5 eV.

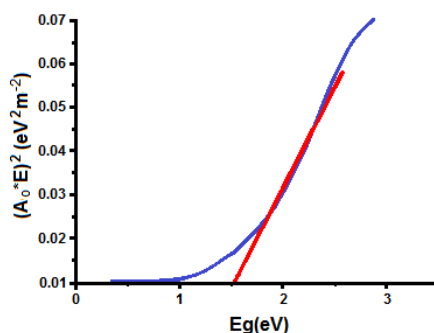


Figura 24. Ploteo de Tauc de la muestra CuSe (C).

De la misma forma, se realiza el análisis espectrofotométrico a la nanoestructura Cu₂Se sintetizada mediante mecano-síntesis, la figura 25 presenta su espectro de absorción UV-VIS a una concentración de 0.253 mmol/L, donde se observa una banda de absorción máxima aproximadamente a 340 nm. Las absorciones son usadas para el ploteo de Tauc, graficando

$(A_0 \cdot E)^2$ vs (E_g) como en el caso anterior, donde la energía de banda prohibida directa se obtiene al trazar una tangente sobre la curva cuyo intercepto con el eje de las abscisas arroja como resultado un valor aproximado E_g de 1.75 eV (figura 26).

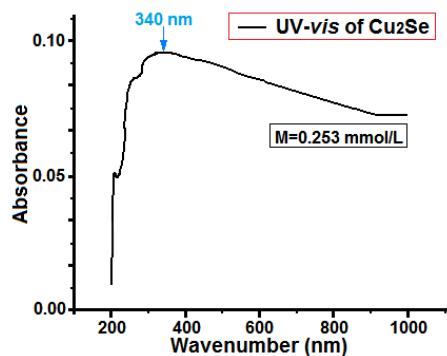


Figura 25. Espectro UV-Vis de la muestra Cu_2Se sintetizada por mecosíntesis.

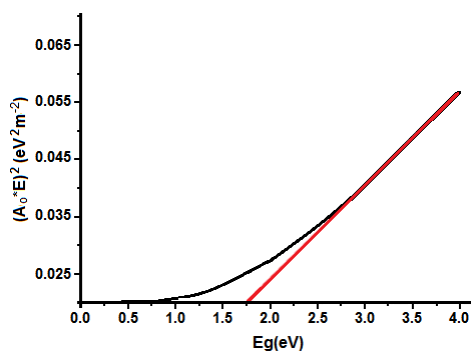


Figura 26. Ploteo de Tauc de la muestra Cu_2Se .

Determinación cualitativa de metales presentes en las muestras

El análisis de las muestras para detectar elementos en bajas concentraciones se realizó mediante la fluorescencia de rayos X. El espectro FR-X de la muestra de seleniuro de cobre producido por mecosíntesis se observa en la figura 27, notando la presencia de cuatro picos preponderantes correspondientes a los elementos cobre y selenio.

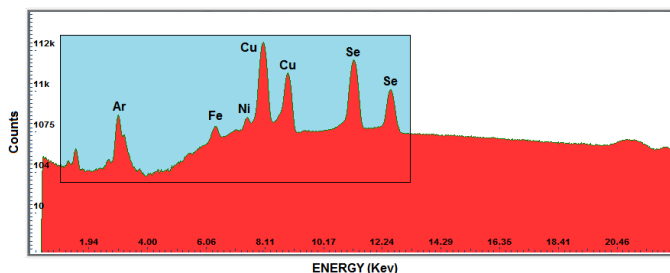


Figura 27. Espectro FR-X de la muestra Cu₂Se.

En la figura 28 se presenta una vista parcial del espectro FR-X, donde la región energética aproximada de análisis fue de 6 a 13 KeV, es la zona de mayor importancia para el presente estudio, pues aquí se encuentran las energías de emisión de los elementos más abundantes, como el cobre, cuyas bandas espectrales se encuentran en las zonas de energías correspondientes a la capa Ka acopladas (KL2 = 8.028 y KL3 = 8,048 KeV) y la capa Kb (KM2 = 8,905 KeV). El segundo elemento en mayor proporción corresponde al selenio con la capa Ka (KL2 = 11.182 y KL3 = 11.222 KeV) y la capa Kb (KM3 = 12.494 y KN3 = 12.652 KeV). También se aprecia la presencia de Argón en buena proporción en respuesta a la radiación asociada al material entre la muestra y el equipo (aire); además, la presencia de trazas de aluminio, hierro, níquel, zinc, cloro y azufre en muy baja proporción respecto a los metales presentes debido al contacto de los reactivos con los materiales utilizados en el proceso de molienda mecánica.

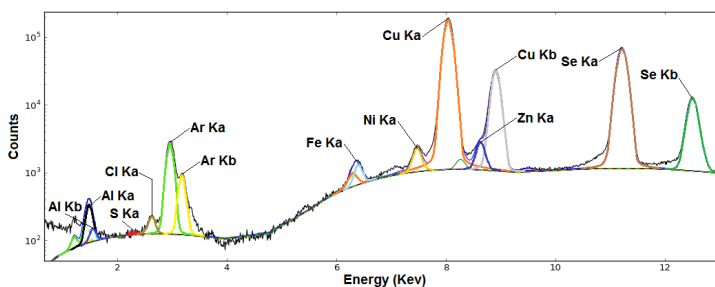


Figura 28. Espectro FRX completo del Cu₂Se utilizando el programa PyMca.

Las siguientes muestras analizadas de seleniuro de cobre corresponden a las sintetizadas por la vía microondas, el espectro FR-X de la muestra CuSe (A) se muestra en la figura 29, donde se indican los principales elementos identificados como el cobre, selenio y azufre. La presencia de este último elemento se debe al compuesto Na₂SO₃ que es el agente reductor utilizado en todas las síntesis vía microondas.

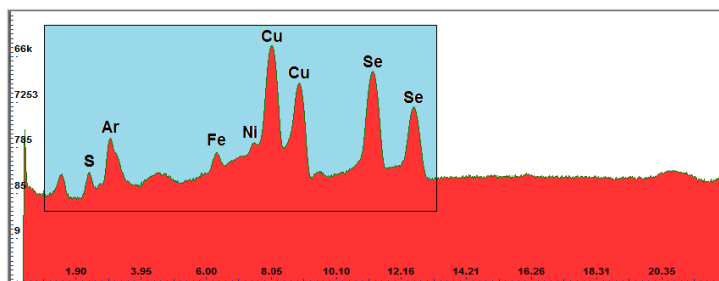


Figura 29. Espectro FRX de la muestra CuSe(A).

CONCLUSIONES

Se sintetizaron nanoestructuras de selenio de cobre mediante las técnicas microondas y mecano-síntesis. En la muestra CuSe(A) con una proporción Cu:Se=2:1, se formaron las fases $\text{Cu}_3\text{Se}_2 + \text{Cu}_2\text{Se}$, en el CuSe(B) con una proporción Cu:Se=2:1 se genera la mezcla de fases $\text{Cu}_3\text{Se}_2 + \text{Cu}_{1,8}\text{Se}$ y solo aparece una única fase de $\text{Cu}_{1,8}\text{Se}$ en CuSe(C) al emplear la proporción Cu:Se=3:2. Por lo tanto, la proporción Cu:Se empleada en los tres experimentos tiene un efecto significativo en la formación de las fases de selenio de cobre. La técnica microondas permitió obtener nanoestructuras solamente con fases de selenio de cobre sin impurezas, lo cual hace que sea la técnica más adecuada para la fabricación de celdas solares, no se recomendaría emplear la mecano-síntesis para producir selenio de cobre ya que se obtuvo una fase ajena impura de óxido de cobre y trazas de metales que solo se pudieron detectar mediante el análisis FR-X. La morfología superficial de las estructuras de selenio de cobre, dependen del método empleado para sintetizarlas, el incremento de las imperfecciones y defectos superficiales del Cu_2Se producido por la molienda de alta energía facilitaría el dopaje para la producción de materiales más complejos y con otros usos. La banda de energía prohibida directa obtenida de las muestras producidas por ambas técnicas de síntesis se encuentra entre 1 y 2 eV, por lo tanto, estos materiales pueden ser utilizados para fabricar células solares²⁴.

AGRADECIMIENTO

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) del Ministerio de la Producción que a través del financiamiento al proyecto N° 357-PNICP-PIBA-2014, denominado “Estudio y desarrollo de compósitos termoplásticos bactericidas para el sector de envases plásticos de uso comercial (PET - Polyethylene Glycol Terephthalate) conteniendo nanocobre y nanoplata. (Masterbatch de PET con nanocobre y nanoplata)”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bhuse VM, Hankare PP. A simple, convenient, low temperature route to grow polycrystalline copper selenide thin films. *Mater Chem Phys*. 2003; 80: 82-88.
2. Subas R, Jagminas A. Optical investigation and application of copper selenide nanowires. *Lith J Phys*. 2007; 47: 361-364.
3. Yeong-Hui S, Byung-Seok L. Facile Microwave-Assisted Synthesis of Multiphase CuInSe₂ Nanoparticles and Role of Secondary CuSe Phase on Photovoltaic Device Performance. *J Phys Chem C*. 2013; 117: 9529-9536.
4. Chenglong S, Xuekui X. Atomic-Level Characterization of Dynamics of Copper Ions in CuAgSe. *J Phys Chem C*. 2016; 120: 3229-3234.
5. Jun X, Weixin Z, Zeheng Y. Large-Scale Synthesis of Long Crystalline Cu₂-xSe Nanowire Bundles by Water-Evaporation-Induced Self-Assembly and Their Application in Gas Sensing. *Adv Funct Mater*. 2009; 19: 1759-1766.
6. Lakshmikummar ST, Rastogi AC. Selenization of Cu and In thin films for the preparation of selenide photo-absorber layers in solar cells using Se vapour source. *Sol. Energy Mater Sol Cells*. 1994; 32: 7-19.
7. Kaviyarasu K, Ayeshamariam A. Solution processing of CuSe quantum dots: Photocatalytic activity under RhB for UV and visible-light solar irradiation. *Mater Sci Eng B*. 2016; 210: 1-9.
8. Kingston SJ, Haswell SJ. Microwave-enhanced Chemistry. *J Am Chem Soc*. 1997; 1: 3-20.
9. Peña VA. Mecanosíntesis. *Revista de investigación de Física*. 1998; 1: 1-25.
10. Xie Y, Zheng X. Sonochemical synthesis and mechanistic study of copper selenides Cu₂-xSe, β-CuSe, and Cu₃Se₂. *Inorg Chem*. 2002; 41: 387-392.
11. Dhasade S, Thombare J. Copper selenide nanorods grown at room temperature by electrodeposition. *Mater Sci Semicond Process*. 2015; 30: 48-55.
12. Peranantham P, Jeyachandran YL. The effect of annealing on vacuum-evaporated copper selenide and indium telluride thin films. *Mater Charact*. 2007; 58: 756-764.
13. Gurin VS, Alexeenko A. Copper and copper selenide nanoparticles in the sol-gel matrices: Structural and optical. *Mater Sci Eng C*. 2006; 26: 952-955.
14. Lakshmi M, Bindu K. Chemical bath deposition of different phases of copper selenide thin films by controlling bath parameters. *Thin Solid Films*. 2000; 370: 89-95.
15. Naghavi N, Spiering S. High-efficiency copper indium gallium diselenide (CIGS) solar cells with indium sulfide buffer layers deposited by atomic layer chemical vapor deposition (ALCVD). *Photovoltaics*. 2003; 11: 437-443.
16. Ming X, Yong Z. Fabrication and Electrochemical Characterization of Copper Selenide Thin Films by Pulsed Laser Deposition. *J Electrochem Soc*. 2006; 153: 2262-2268.
17. Kumar P, Singh K. Template free-solvothermal synthesized copper selenide (CuSe, Cu₂-xSe, β-Cu₂Se and Cu₂Se) hexagonal nanoplates from different precursors at low temperature. *J Cryst Growth*. 2010; 312: 2804-2813.
18. Frangis N, Manolikas C. Vacancy-Ordered Superstructures in Cu₂Se. *Phys Status Solidi*. 1991; 126: 9-22.
19. Kalenga MP, Govindraju S. Fabrication of a Schottky Device Using CuSe Nanoparticles:

- Colloidal versus Microwave Digestive Synthesis. *J Nanosci Nanotechnol.* 2015; 15: 4480-4486.
20. Yong-Qiang L, Feng-Xia W. Facile Microwave-Assisted Synthesis of Klockmannite CuSe Nanosheets and Their Exceptional Electrical Properties. *Sci Rep.* 2014; 4: 1-8.
 21. Machado KD, de Lima JC, Grandi TA, Campos CE, Maurmann CE, Gasperini AA, et al. Structural study of Cu(2-x)Se alloys produced by mechanical alloying. *Acta Crystallogr B.* 2004; 60:282-6.
 22. Viezbicke B. Evaluation of the Tauc method for optical absorption edge determination: ZnO thin films as a model system. *Phys Status Solidi.* 2015; 1: 1-11.
 23. Suryanarayana C. *Mechanical Alloying and Milling.* New York: Marcel Dekker; 2003. 66-68 p.
 24. Bottecchia OL. A Model of the Growth of Copper Selenide Thin Films Controlled by Diffusion and Chemical Reaction. *J Braz Chem.* 1998; 9: 515-520.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE (NPs Cu) POR EL MÉTODO POLIOL ASISTIDO VÍA MICROONDAS (MW)

Aldo Javier Guzmán Duxtan^{*a}, Joel Claudio Rengifo Maraví^a,
Jezabel Milagros Echevarría Muñoz^a

RESUMEN

En el presente trabajo se describe la síntesis de nanopartículas de cobre (NPs Cu) por el método de polioliol asistido vía microondas (MW), a partir del precursor acetato de cobre sintetizado, $\text{Cu}(\text{Ac})_2$. El precursor se sintetizó usando la técnica Schlenk con calentamiento convencional bajo reflujo en un tiempo mayor a 8 horas. Los reactivos que se utilizaron para preparar las NPs Cu fueron el Etilenglicol (EG) como solvente, polivinilpirrolidona (PVP) como agente dispersante, ácido ascórbico (AA) y ácido cítrico (AC) como agentes reductores. El proceso de síntesis se realizó en un horno MW adaptado para síntesis química. Se evaluó tres variables para observar la influencia en el tamaño de las nanopartículas, tales como la relación molar AA/Cu(Ac)₂, el peso molecular del PVP de 10KD, 40KD y el tipo de procedimiento. Tanto el precursor como las NPs Cu se caracterizaron con las técnicas UV-Vis, DRX FTIR-ATR y FRX. Finalmente, se realizó la deconvolución del plasmón superficial característico de las NPs Cu espectro UV-Vis y mediante el análisis factorial se estimó las tendencias del tamaño de grano a partir de la longitud de onda y el ancho de banda de las funciones resultantes de la deconvolución.

Palabras clave: Nanopartículas de cobre, acetato de cobre, polioliol, microondas, deconvolución, análisis factorial.

^a Laboratorio de Química Cuántica, Nuevos Materiales e Innovación Tecnológica (LQCNMIT), del Departamento Académico de Físicoquímica de la FQIQ, UNMSM.

*aldo.guzman@unmsm.edu.pe

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF COPPER NANOPARTICLES (Cu NPs) BY METHOD POLIOL ASSISTED VIA MICROWAVE (MW)

ABSTRACT

This paper describes the synthesis of copper nanoparticles (Cu NPs) by the microwave-assisted polyol method (MW) from a synthesized copper acetate precursor, $\text{Cu}(\text{Ac})_2$. The precursor was synthesized using the Schlenk with technique conventional heating under reflux in a time greater than 8 hours. The reagents that were used to prepare Cu NPs were Ethylene glycol (EG) as solvent, polyvinylpyrrolidone (PVP) as dispersing agent, ascorbic acid (AA) and citric acid (AC) as reducing agents. The synthesis process was carried out in an MW furnace adapted for chemical synthesis. Three variables were evaluated to observe the influence on the size of the nanoparticles, such as the AA/ $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ mole ratio, the molecular weight of the PVP 10KD, 40KD and the type of procedure. The Precursor and the Cu NPs were characterized with UV-Vis, DRX FTIR-ATR and FRX techniques. Finally, the deconvolution of surface plasmon characteristic of the Cu NPs in the UV-Vis spectrum was performed and, by means of factorial analysis, grain size trends were estimated from wavelength and bandwidth of the resulting functions of the deconvolution.

Key words: Copper nanoparticles, copper acetate, polyol, microwave, deconvolution, factor analysis.

INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas de cobre (NPs Cu) han atraído un gran interés durante los últimos años debido a sus características y excelentes propiedades físicas y químicas que se diferencian de las partículas de mayor tamaño. Las propiedades mejoradas son producto del tamaño nanométrico, la morfología de la superficie y el área superficial, debido al efecto del confinamiento cuántico. En el área de la catálisis heterogénea se utiliza con mayor frecuencia como catalizadores en la electroremediación de aguas contaminadas y en la desintoxicación de gases¹. En la electrónica como electrodos, líneas conductoras y tintas de impresión en la microfabricación de conductores². Por otro lado, se han considerado como una alternativa de las nanopartículas de oro (NPs Au), de plata (NPs Ag) y de platino (NPs Pt)³, teniendo en cuenta al cobre metálico que es un material más rentable.

El método de poliol se utiliza para sintetizar nanopartículas de diferentes metales consiste de manera general en utilizar un poliol como solvente y agente dispersante, siendo este uno de los métodos más utilizados en la síntesis química de NPs Cu. Yu y su equipo⁴, sintetizaron NPs Cu con tamaño de partícula entre 5-10nm mediante el método Poliol, utilizando agua y EG como solventes, AA como agente antioxidante y reductor y PVP como controlador

de tamaño y agente dispersante. Zhang⁵ preparó NPs Cu estables con un tamaño promedio entre $1,4 \pm 0,6$ nm a $3,1 \pm 0,5$ nm y con una morfología esférica sintetizada a temperatura ambiente, utilizando EG, NaBH_4 como agente reductor con un copolímero de etileno en medio alcalino y PVP; determinando que el aumento de la relación Precursor/PVP disminuye el tamaño de las NPs. Chum⁶ a diferencia de los antecedentes anteriores utilizaron como intermediario un complejo PVP-Cu^{+1} que luego fue reducido por NaBH_4 formando las NPs Cu entre 9-33 nm que se aplicaron en tintas conductoras. Planteó que la formación del complejo PVP-Cu^{+1} favoreció la dispersión de las nanopartículas, disminuyendo la velocidad de crecimiento de las NPs Cu.

El método del poliol también se puede utilizar mediante el calentamiento MW. Blosi⁷, planteó la preparación de NPs Cu a partir de acetato de Cu monohidratado, EG, PVP y AA; mediante el calentamiento vía MW, determinó la influencia de los parámetros como la relación molar del agente reductor/precursor, temperatura y el orden de adición de los reactivos en la optimización del proceso, obteniendo NPs Cu de 46 ± 9 nm. En cambio, Kawasaki y su equipo⁸, sintetizaron nanoclusters Cu sin la adición de un agente reductor fuerte y agente protector; se realizó a partir de cloruro de cobre, EG y NaOH con calentamiento vía MW en atmósfera de nitrógeno. Nikkam⁹, utilizó un reactor MW, utilizó acetato de Cu monohidratado como precursor, EG, PVP y AA, mediante este procedimiento se obtuvieron NPs Cu esféricas con un tamaño de partícula entre 75 ± 25 nm. De forma similar Nishioka y su equipo¹⁰, sintetizaron NPs Cu de un tamaño de 63 nm, a partir de acetato de cobre, EG y PVP, llevándolo a cabo en un reactor en flujo con MW. A diferencia del grupo de investigación de Raspolli¹¹, que sintetizaron NPs Cu en ausencia de un agente estabilizante, partieron de acetato de cobre, pero utilizaron al etanol como solvente, AA como agente reductor y NaOH, llevando a cabo la reacción en un reactor MW; las NPs Cu obtenidas tuvieron un menor tamaño $8,7 \pm 3,9$ nm. Por tanto, se deduce que, el método de poliol asistido vía MW también permite obtener NPs Cu con una baja distribución de tamaño de partícula y con una morfología controlada, siendo más eficiente con respecto al calentamiento convencional, ya que se acelera la reacción química, obteniendo el producto en un menor tiempo.

En este trabajo se sintetizó NPs Cu por el método poliol asistido vía MW y se evaluó la influencia del tipo de procedimiento a seguir, la relación molar de agente reductor/precursor de cobre ($\text{AA/Cu}(\text{Ac})_2$), y el peso molecular del PVP, para identificar las condiciones óptimas de síntesis mediante la deconvolución de los espectros UV-Vis y el análisis factorial. Las NPs Cu se caracterizaron mediante las técnicas UV-VIS, DRX y FRX.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

Ácido acético glacial (Merck Millipore), anhídrido acético (Merck Millipore), $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ (sintetizado en el laboratorio con 99 % de pureza), EG (Merck Millipore), AA (Sigma Aldrich), AC (Sigma Aldrich), PVP de 10KD y 40KD (Sigma Aldrich), óxido cúprico (sintetizado en el laboratorio con 99 % de pureza).

Materiales

Balones de 250mL, tubos Schlenk de 100ml, línea Schlenk para aplicaciones en atmósfera controlada y vacía, filtros Schlenk para atmósfera inerte, columnas refrigerantes de tipo serpentín y Liebig, dos trampas para gases (con silicona líquida) con conexión a sistema de reflujo, sistema para flujo de nitrógeno (cilindro de nitrógeno 5,0, válvulas y mangueras).

Equipos

Horno MW (SAMSUNG) adaptado para síntesis química modelo AMW784S, bomba de vacío (Vacuubrand) modelo RZ 2,5, dos agitadores magnéticos (AREX), balanza analítica (Kern) modelo AB120-4, equipo de ultrasonido modelo GE 600.

Síntesis del precursor Cu(Ac)₂

Primeramente, se calculó la masa del óxido cúprico, los volúmenes del ácido acético y anhídrido acético, utilizando un exceso de ácido acético respecto a la cantidad de moles del óxido cúprico y la relación entre el ácido acético y anhídrido acético fue (1:1). Luego, para la reacción, se armó el sistema Schlenk conectado a reflujo, los reactivos se colocaron en un balón, luego se mantuvo a agitación constante y se calentó a través de un baño de silicona a una temperatura de 150°C por un tiempo mayor a 8 horas bajo una atmósfera inerte. Después se filtró la solución obtenida en un sistema de filtración Schlenk que permitió la transferencia y separación del complejo anhidro de Cu(Ac)₂ en una atmósfera inerte. A continuación, este producto fue lavado con éter etílico para arrastrar al solvente orgánico y se dejó a presión reducida por una hora, para extraer al solvente remante.



Figura 1. Imágenes del sistema Schlenk para la preparación de Cu(Ac)₂.

Síntesis de NPs Cu:

Para un mejor diseño experimental se realizó el análisis factorial, las variables a analizar en la síntesis fueron la relación molar del AA/Cu(Ac)₂ de 2,5 o 7,5, el peso molecular del PVP de 10KD o 40KD y el tipo de procedimiento A o B; siendo el número de factores de tres, analizando para dos niveles por cada factor el número de experimentos es de 2³, es decir, ocho. En las tablas 1 y 2 se detallan las condiciones de estos experimentos.

En el procedimiento A el precursor $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ se agregó antes del calentamiento y el AA después de 3 min. Mientras que en el procedimiento B, se agregaron de manera inversa, el AA fue el que se agregó antes y el precursor después.

Procedimiento A:

Se disolvió 0,0412g de $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ en 10mL de EG por ultrasonido y por separado 0,4515g de PVP en 10mL de EG. Luego se procedió a mezclar las dos soluciones en un balón con agitación a 500 rpm durante 15 min. Por otro lado, se disolvió 0,10g de AA en 10mL de EG por ultrasonido y cuya relación molar con $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ fue 2,5 (y para que la relación molar sea 7,5 se pesó 0,3g), luego se vertió a un embudo Schlenk, paralelamente se disolvió 0,12g de AC en 10mL de EG y se vertió a otro embudo Schlenk. El balón que contiene la solución del precursor metálico y PVP en EG, se colocó dentro del horno MW (figura 2) y se calentó con reflujo constante en un tiempo total de 10 min a una potencia de 10 % de ciclo de irradiación. El AA se vertió gota a gota después de 3 min de haber iniciado el calentamiento y el AC después de 7 min, a través de los respectivos embudos Schlenk, el volumen total de EG fue 50mL. El color rojo-pardo de la solución resultante evidenció la formación de las NPs Cu (figura 3).

Procedimiento B:

Es similar al procedimiento anterior, con la diferencia de que inicialmente se vertió la solución de AA y no el precursor metálico. Después de 3 min de haber iniciado el calentamiento en lugar de añadir AA se agregó el precursor metálico. Las cantidades y proporciones fueron las mismas.



Figura 2. Microondas adaptado para síntesis química.



Figura 3. Solución de NPs Cu sintetizadas (color rojo-pardo).

Tabla 1. Datos de las condiciones de síntesis de las NPs Cu.

Condiciones	A.1	A.2	A.3	A.4	B.1	B.2	B.3	B.4
Cu(Ac) ₂ (mM)	5,67	5,67	5,67	5,67	5,67	5,67	5,67	5,67
PVP (mM)	99,9	99,9	24,9	24,9	99,9	99,9	24,9	24,9
AA (mM)	14,2	42,6	14,2	42,6	14,2	42,6	14,2	42,6
AC (Mm)	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3
PVP (KD)	10	10	40	40	10	10	40	40
Relación molar AA/Cu(Ac) ₂	2,5	7,5	2,5	7,5	2,5	7,5	2,5	7,5
pH resultante	4,5	4	4,5	4	5	4,5	5	4,5

Para cada uno de los procedimientos, los ensayos 1 y 3 se diferenciaron de los ensayos 2 y 4 por la cantidad añadida de AA y por consiguiente también en la relación molar de AA/Cu(Ac)₂. Mientras que los ensayos 1 y 2 se diferenciaron de los ensayos 3 y 4, en el tipo de PVP utilizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El precursor acetato de cobre cumple un efecto estabilizante en la síntesis de las NPs Cu, ya que los iones carboxilatos también estabilizan y se adhieren a la superficie de las NPs Cu, teniendo un efecto similar al PVP, AA y AC². Dentro de los carboxilatos cobre el más utilizado es el acetato de cobre, este puede estar de forma anhidra o hidrata, el más comercial es la forma hidratada. Sin embargo, en el mecanismo de las NPs Cu se forma la fase de óxido de cobre (Cu₂O) que es un intermediario¹¹, esta fase se puede favorecer en la síntesis si hay presencia de agua, por lo que se trabajó con Cu(Ac₂) anhidro.

En la formación de las NPs Cu según los reactivos utilizados y los antecedentes, inicia cuando el Cu(Ac)₂ se disuelve formando los iones Ac⁻ y Cu⁺², luego este último reacciona con AA

reduciéndose primero a Cu^{+1} formándose nanopartículas de Cu_2O que tiene un color amarillo, posteriormente el AA sigue reduciendo al Cu_2O formando NPs Cu metálicas⁷, además AA se oxida formando al ácido desoxiascórbito. Cuando hay un mayor exceso de AA se favorecerá velocidad de nucleación sobre la velocidad de crecimiento, por lo que obtendrá NPs Cu de menor tamaño⁹. Por otro lado, cuando se realiza la síntesis de NPs Cu en pH ácido se favorece la fase metálica de Cu sobre la fase Cu_2O .

Caracterización del precursor $\text{Cu}(\text{Ac})_2$

Difracción de rayos X (DRX)

En la figura 4 se observa el difractograma de Rayos X del $\text{Cu}(\text{Ac})_2$, los picos característicos se presentan en los ángulos $2\theta=11,24$; $11,96$; $14,76$ y al compararlo con los patrones estándares obtenidos de la base de datos (PDF: 27-1126), se confirmó la estructura monoclinica del $\text{Cu}(\text{Ac})_2$.

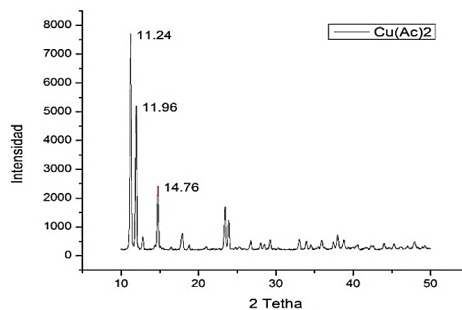


Figura 4. Difractograma del precursor $\text{Cu}(\text{Ac})_2$.

Espectroscopía FTIR-ATR

Se caracterizó al precursor $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ mediante la técnica espectroscópica FTIR-ATR. Según Bellamy¹², las bandas de absorción del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) a 1.730cm^{-1} y del grupo $\text{C}-\text{O}$ entre $1225-1268\text{cm}^{-1}$ en las sales que provenientes de ácidos carboxílicos fuertes, estas bandas que se encuentran comúnmente en la región de los ácidos y ésteres desaparecen y son reemplazadas por otras dos bandas correspondientes al grupo $-\text{COO}_{\text{as}}^-$ (asimétrico) entre $1610-1550\text{cm}^{-1}$ y al $-\text{COO}_{\text{s}}^-$ (simétrico) entre $1300-1420\text{cm}^{-1}$. Porque se produce la resonancia de la ionización del grupo carboxilato. La presencia del grupo carboxilato del $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ en el espectro IR (figura 5) se confirma con la presencia de las dos bandas mencionadas anteriormente.

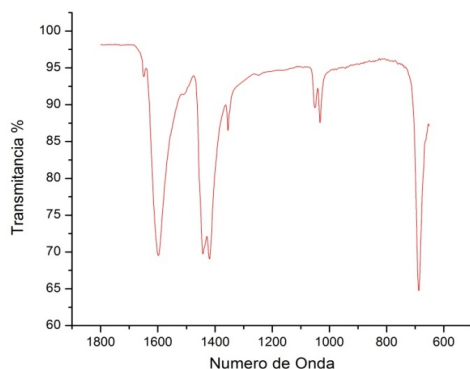


Figura 5. Espectro FTIR-ATR del precursor $\text{Cu}(\text{Ac})_2$.

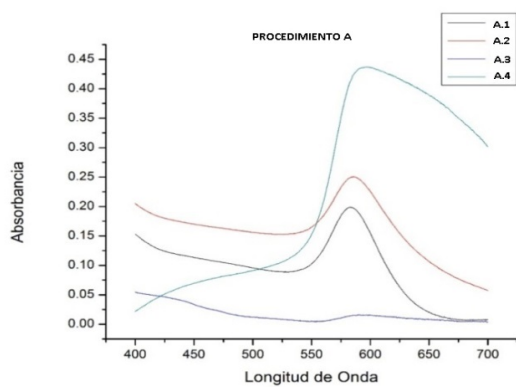
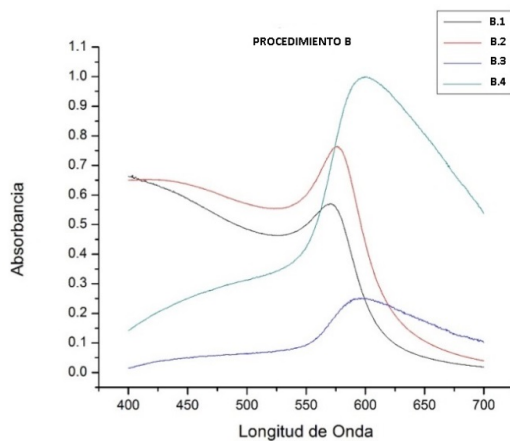
Caracterización de las NPs Cu

Espectroscopía UV-VIS

Los espectros UV-Vis de las NPs Cu, sintetizadas mediante los procedimientos A y B, se muestran en las figuras 7 y 8, además las respectivas longitudes de onda máximas experimentales del plasmón superficial se observan en la tabla 2, esto confirma la presencia de las NPs Cu. De estos en los experimentos A1, A2, A4, B1, B2 y B4 se observa claramente el plasmón superficial de las NPs Cu, mientras que en el experimento B3 la banda del plasmón es más ancha y en el experimento A.3 apenas se observa. Por consiguiente, las NPs Cu mencionadas en primeros experimentos tienen un menor tamaño de partícula que las síntesis A3 y B3. Esto se debe a que en estas síntesis se utilizó una relación molar de AA/ $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ de 2,5 y el PVP utilizado fue 10KD. Ya que cuando la relación molar de AA/ $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ es mayor o igual a 5 se favorece más la reducción de los iones Cu^{+2} produciendo NPs Cu, favoreciendo la velocidad de nucleación sobre la velocidad de crecimiento por el método del poliol^{7,15}. Adicionalmente, en las síntesis se utiliza el PVP de 40KD que a pesar de tener un mayor peso molecular que el PVP de 10KD, como se trabaja con el mismo peso hay cuatro veces menos PVP, por lo que el efecto dispersante será menor. Y de estos dos experimentos el de A3 está menos favorecido debido a que en el método A cuando se agrega gota a gota sobre la solución de $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ a la solución de AA en la reacción, al inicio el $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ a diferencia del método A en el que AA en todo momento está en exceso durante la reacción. Estos efectos explicados son sinérgicos, pero de manera desfavorables para los experimentos A3 y B3.

Tabla 2. Longitudes de onda de las bandas de plasmón experimentales (exp.) y calculadas (cal.) y FWHM de las NPs Cu sintetizadas.

Condiciones	A.1	A.2	A.3	A.4	B.1	B.2	B.3	B.4
Cu(Ac) ₂ (mM)	5,67	5,67	5,67	5,67	5,67	5,67	5,67	5,67
PVP (mM)	99,9	99,9	24,9	24,9	99,9	99,9	24,9	24,9
AA (mM)	14,2	42,6	14,2	42,6	14,2	42,6	14,2	42,6
AC (Mm)	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3
PVP (KD)	10	10	40	40	10	10	40	40
Relación molar AA/Cu(Ac) ₂	2,5	7,5	2,5	7,5	2,5	7,5	2,5	7,5
pH resultante	4,5	4	4,5	4	5	4,5	5	4,5

**Figura 6.** Espectro UV-Vis de las NPs Cu sintetizadas mediante los ensayos del procedimiento A.**Figura 7.** Espectro UV-Vis de las NPs Cu sintetizadas mediante los ensayos del procedimiento A.

Deconvolución de los espectros UV-Vis.

A cada uno de los espectros UV-Vis se les realizó la deconvolución en la región comprendida entre 520-640nm dentro del cual se encuentra la banda del plasmón característico de NPs Cu. Se utilizaron funciones del tipo gaussiana que son las más apropiadas según Pekian¹⁴ y estas representan las NPs Cu con tamaños similares. La función gaussiana de mayor tamaño es la principal, porque esta representa al grupo de NPs mayoritaria que hay muestra. Las longitudes de onda máxima calculadas y el ancho de banda de base media (abreviada en inglés FWHM) calculadas de las gaussianas principales, se detallan en la tabla 2. Todas las deconvoluciones se realizaron con un Chi cuadrado reducido menor a $3,00 \times 10^{-5}$, (suma de las gaussianas 1, 2 y 3). En las figuras 9 y 10 se muestran las bandas del espectro experimental de los procedimientos A.1 y B.1, respectivamente, la suma de las funciones y las funciones que conforman la gaussiana acumulada. Las deconvoluciones se realizaron con el programa Origin Pro 9.0.

Las NPs Cu que tienen un menor FWHM nos indica que las NPs tienen un menor tamaño de partícula¹³. Además, Blosi⁷, comprobó experimentalmente que cuando el tamaño de la NPs partícula es más pequeño, el plasmón de Cu⁰ tiene un desplazamiento hipsocrómico, y cuando el tamaño de la partícula es más grande tiene un desplazamiento batocrómico.

Como se observa en la tabla 2, en la longitud de banda del plasmón experimental hay un desplazamiento batocrómico de las muestras A.3 y A.4 así como en B3 y B4. Pero cuando se analizas la longitud de la banda del plasmón calculado y FWHM calculados, las muestras que tienen un mayor desplazamiento batocrómico y un mayor FWHM son las muestras A3 y B3 para los procedimientos A y procedimiento B. Por los que estas muestras de NPs Cu serían las que tiene un mayor tamaño de partícula, concordando estos resultados con el análisis cualitativo de los espectros UV-Vis de las NPs Cu en la anterior sección.

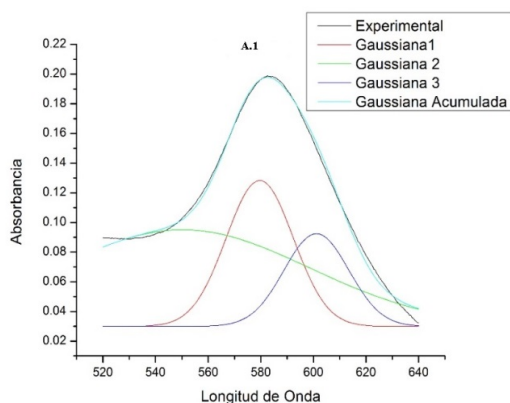


Figura 8. Deconvolución del espectro UV-Vis de NPs Cu sintetizadas por el procedimiento A.1.

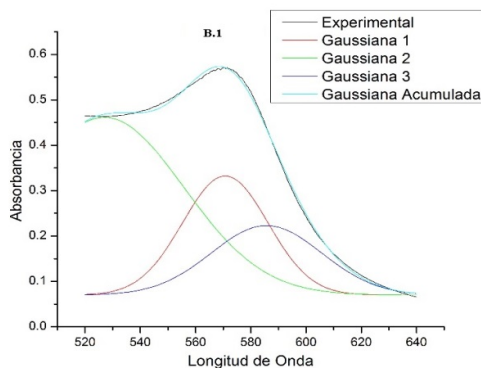


Figura 9. Deconvolución del espectro UV-Vis de NPs Cu sintetizadas por el procedimiento B.1.

Análisis factorial

En el análisis factorial se realizó para dos niveles y tres factores como se detalló en el procedimiento experimental y se evaluaron sus efectos sobre el ancho de banda de base media (FWHM) calculada y la longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) calculada. Los resultados de los efectos principales del análisis factorial se muestran en las figuras 10 y 11.

En estas figuras se observa que el procedimiento B en comparación con el procedimiento A favorece la formación de NPs Cu de menor tamaño, ya que el FWHM es menor y la longitud de onda máxima tiene menores valores, es decir, hay un desplazamiento hipsocrómico. Esto es debido a que en la síntesis la solución de PVP y $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ se agrega sobre la solución de AA, por lo que el AA desde el inicio de la reacción está en exceso.

Como se mencionó anteriormente cuando se trabaja con un mismo peso el PVP de 10KD tiene un mayor efecto dispersante que el PVP de 40KD, en la figura 10 esto se demuestra en las figuras 11 y 12 donde el PVP de 10KD favorecen una menor longitud del plasmón y un menor FWHM.

En los antecedentes de síntesis tipo poliol^{7,15}, mencionaron que la relación molar de $\text{AA}/\text{Cu}(\text{Ac})_2$, al ser mayor o igual a 5, favorece la formación de partículas de menor tamaño. En la figura 10 se observa que el FWHM es menor cuando la relación molar es de 7,5 en la síntesis, pero la influencia de la longitud del plasmón es casi igual para ambas relaciones molares. Por lo que la influencia en las relaciones molares no es tan significativa como en el caso de los métodos de síntesis de poliol, mediante calentamiento MW a diferencia del método del poliol por calentamiento convencional.

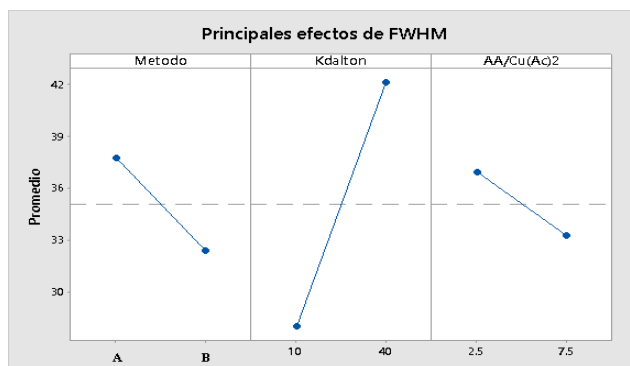


Figura 10. Diagrama de efectos principales para la variable de respuesta FWHM.

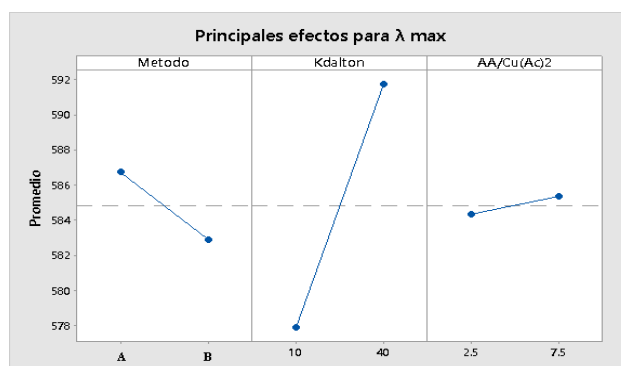


Figura 11. Diagrama de efectos principales para la variable de respuesta λ máx.

El análisis factorial se realizó con el programa Minitab 16.

Difracción de rayos X (DRX)

En la figura 12, se observa el difractograma de las NPs Cu para una de las muestras sintetizadas, los picos de difracción con intensidades fuertes aparecen en ángulos de $2\theta = 43,37$ y $50,5$; correspondientes a los planos (111) y (200) de la estructura cúbica centrada en las caras (fcc). Los dos picos de difracción concuerdan con dos de las tres señales del patrón estándar de cobre (pdf número 4-836). El tercer pico perteneciente al plano (220) no se observa, debido a la baja intensidad, siendo eliminado en el refinamiento de la línea base. Con los picos mencionados se confirmó la fase de metálica de las NPs Cu.

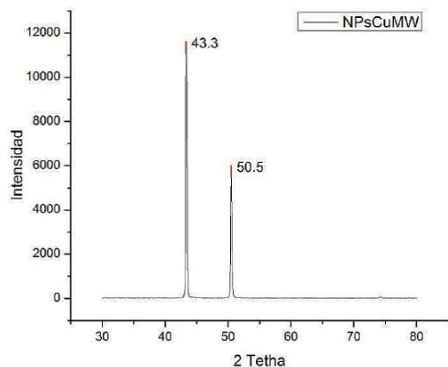


Figura 12. Difractograma de las NPs Cu sintetizadas.

El tamaño promedio de grano de las NPs Cu se calculó mediante la ecuación Debye-Scherrer y fue de 43,9nm, confirmándose la presencia de NPs Cu.

Dispersión de luz dinámica (DLS)

En la figura 13 se observa el resultado de la caracterización por DLS de una muestra de las NPs Cu. El tamaño medio de las NPs Cu fue 90.9nm y de esta manera se confirmó la dimensión nanométrica de las partículas. Además, se observó dos distribuciones de NPs formadas en la muestra. El tamaño medio hallado por DLS es mayor del calculado por DRX porque considera el tamaño del radio hidrodinámico de la NPs. El PVP al adherirse a las NPs incrementa el radio hidrodinámico de las nanopartículas y por consiguiente aumenta el tamaño medio hallado por DLS.

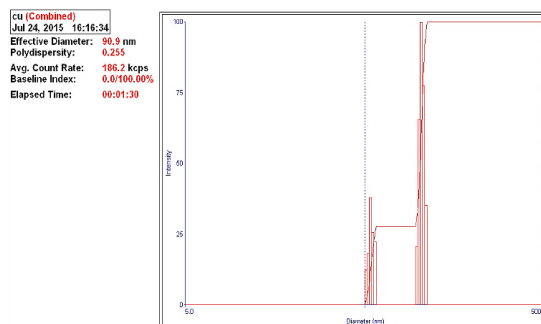


Figura 13. Imagen del resultado del software del DLS.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes del SEM de las NPs Cu se observan en la figura 14, ambas imágenes pertenecen a la misma muestra con diferentes aumentos, se observa algunas de mayor y otras de menor tamaño, debido a que algunas NPs Cu se han aglomerado formando NPs secundarias más grande, esto se debe a que en la medición de la muestra con el equipo SEM fueron realizada tres meses después de la síntesis, dando tiempo a un mayor efecto del fenómeno de coalescencia. La morfología de estas partículas es diversa. La medición de la muestra se realizó en el solvente original, donde las nanopartículas están en una suspensión de etilenglicol, por lo que se utilizó el modo ambiental, no se pudo realizar mediciones a mayores aumentos, ya que en el modo ambiental no se ejerce una mayor presión de vacío, ya que los electrones necesitan un alto vacío para mejorar la resolución.

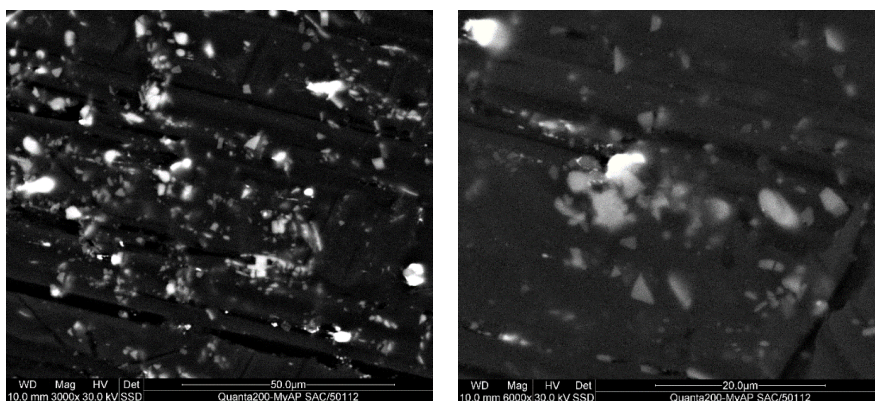


Figura 14. Imágenes SEM de las NPs Cu: a 3000 de aumento (izquierda), a 600 de aumento (derecha).

CONCLUSIONES

Los resultados indicaron que se logró sintetizar NPs Cu con los métodos mostrados, observando el plasmón característico en el espectro UV-Vis. El resultado del tamaño de grano por DRX, de una de las muestras, fue de 44nm y el tamaño del radio hidrodinámico por DLS fue de 90.9nm confirmando la presencia de NPs Cu. En la evaluación de los dos procedimientos de síntesis (A y B), en ambos se obtuvieron NPs Cu, pero el procedimiento B fue mejor que el procedimiento A pues las NPs Cu sintetizadas tuvieron menor tamaño, lo cual fue demostrado mediante la deconvolución de los espectros UV-Vis y el análisis factorial. Con el mismo criterio también se determinó que para un mismo peso de PVP las síntesis de nanopartículas de cobre se favorecen cuando el peso molecular del PVP es menor que fue de 10KD.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al FINCyT por todo el financiamiento brindado en el desarrollo de esta investigación mediante el proyecto N° 135-FINCyT-IB-2013. A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por ser una gran institución y brindarnos la oportunidad de pertenecer a ella.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barrabés N, Just J, Dafinov A, Medina F, Fierro JLG, Sueiras JE, et al. Catalytic Reduction of Nitrate on Pt-Cu and Pd-Cu on Active Carbon using Continuous Reactor: The Effect of Copper Nanoparticles. *Appl Catal B-Environ.* 2006; 62: 77-85.
2. Eastman JA, Choi SU, Li S, Yu W, Thompson LJ. Anomalous Increased Effective Thermal Conductivities of Ethylene Glycol-Based Nanofluids Containing Copper Nanoparticles. *Appl Phys Lett.* 2001; 78(6): 718-720.
3. Hoover NN, Auten BJ, Chandler BD. Tuning Supported Catalyst Reactivity with Dendrimer-Templated Pt-Cu Nanoparticles. *J Phys Chem B.* 2006; 110(17): 8606-8612.
4. Yu W, Xie H, Chen L, Li Y, Zhang C. Synthesis and Characterization of Monodispersed Copper Colloids in Polar Solvents. *Nanoscale Res Lett.* 2009; 4(5): 465-470.
5. Zhang H, Siegert U, Liu R, Cai WB. Facile Fabrication of Ultrafine Copper Nanoparticles in Organic Solvent. *Nanoscale Res Lett.* 2009; 4(7): 705-708.
6. Chung SC, Yun HJ, Min GK, Hyuck ML. Control of chemical kinetics for sub-10 nm Cu nanoparticles to fabricate highly conductive ink below 150°C. *Nanotechnol.* 2012;23(6): 5601-5609.
7. Blosi M, Albonetti S, Dondi M, Martelli C, Baldi G. Microwave-assisted polyol synthesis of Cu nanoparticles. *J Nanopart Res.* 2011; 13(1): 127-138.
8. Kawasaki H, Kosaka Y, Myoujin Y. Microwave-assisted polyolsynthesis of copper nanocrystals without using additional protective agents. *Chem Commun.* 2011; 47: 7740-7742
9. Nikkam N, Ghanbarpour M, Saleemi M, Haghighi EB, Khodabandeh R, Muhammeda M, et al. Experimental investigation on thermo-physical properties of copper/diethylene glycol nanofluids fabricated via microwave-assisted route. *Appl Therm Eng.* 2014; 65: 158-165.
10. Nishioka M, Miyakawa M, Daino Y, Kataoka H, Koda H, Sato K, et al. Single-Mode Microwave Reactor Used for Continuous Flow Reactions under Elevated Pressure. *Ind Eng Chem Res.* 2013; 52(12): 4683-4687.
11. Raspolli Galletti AM, Antonelli C, Marracci M, Piccinelli F, Tellini B. Novel microwave-synthesis of Cu nanoparticles in the absence of any stabilizing agent and their antibacterial and antistatic applications. *Appl Surf Sci.* 2013; 280: 610-618.
12. Bellamy L. *The Infra-Red Spectra of Complex Molecules.* New York: Springer Netherlands; 1975.

13. Garcia Rey N. Interaction of a Copper Surface with Light: Plasmons, Electrons & Molecular Vibrations. [Tesis doctoral]. Liverpool, Reino Unido: University of Liverpool; 2011.
14. Pelikan P, Cepan M, Liska M. Application of numerical Methods in Molecular Spectroscopy. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1993
15. Yu W, Xie H, Chen L, Li Y, Zhang C. Synthesis and Characterization of Monodispersed Copper Colloids in Polar Solvents. *Nanoscale Res Lett.* 2009; 4(5): 465-470.

TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO DE LOS EFLUENTES DEL PROCESO DE LAVADO DE LANA EN UNA INDUSTRIA TEXTIL DE AREQUIPA

María Ofelia Guillén Zevallos*¹, Virginia Pérez Murillo^a, Tania Quispe Carrizales^a,
María Elena Talavera Núñez^a, Flora Elsa Huamán Paredes^b

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el tratamiento fisicoquímico de los efluentes de lavado de lana provenientes de una industria textil de la ciudad de Arequipa con la finalidad de cumplir con los Valores Máximos Admisibles (VMA), utilizando como coagulante tricloruro férrico al 40 % y floculante polímero MT-FLOC 4299 al 0,1 %. Se caracterizó física y químicamente el efluente al inicio y al final del tratamiento, midiendo pH, temperatura, demanda bioquímica de oxígeno (DBO5), demanda química de oxígeno (DQO), sólidos totales suspendidos (TSS), aceites y grasas, sulfatos, sulfuros, nitrógeno amoniacal, cianuro total, cromo hexavalente y turbidez. Para determinar las dosis óptimas de coagulante y floculante se realizaron tres tratamientos utilizando un equipo de jarras (Jar-test) a 50, 200 y 40 rpm. El tiempo de sedimentación fue de 10 minutos. Los rangos de turbidez inicial oscilaron entre 200 y 800 NTU obteniéndose una remoción del 89 % en relación a la turbidez promedio de 526,96 NTU. La mejor dosis aplicada al efluente fue 200 mg/L de tricloruro férrico y 0,8 mg/L del floculante polímero catiónico MT-FLOC 4299. Los parámetros de remoción de contaminantes fueron: 84,97 % aceites y grasas; 82,55 % demanda bioquímica de oxígeno; 79,36 % demanda química de oxígeno; 99,60 % sólidos totales suspendidos; 96,67 % sólidos sedimentables y 75,65 % cianuro total, cumpliendo así con la Normativa Peruana, por lo que es factible aplicar el tratamiento a mayor escala.

Palabras clave: Coagulación, floculación, agua residual, textil, lavado de lana.

^a Facultad de Ciencias Naturales y Formales, Departamento Académico de Química. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Santa Catalina N° 117 casilla 23, Arequipa - Perú. *mguillenz@unsa.edu.peb
Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental, Departamento Académico de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Perú.

PHYSICOCHEMICAL TREATMENT OF THE EFFLUENTS OF THE WOOL WASHING PROCESS IN A TEXTILE INDUSTRY OR AREQUIPA

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the physicochemical treatment of wool washing effluents from a textile industry in the city of Arequipa in order to comply with the Maximum Admissible Values (VMA), using 40% ferric trichloride as coagulant and 0,1% MT-FLOC 4299 polymer flocculant. The effluent was physically and chemically characterized at the beginning and at the end of the treatment, measuring pH, temperature, Biochemical Oxygen Demand (BOD), Chemical Oxygen Demand (COD), total suspended solids (TSS), oils and fats, sulfates, ilosulphides, ammoniacal nitrogen, total cyanide, hexavalent chromium and turbidity. To determine the optimal doses of coagulant and flocculent, three treatments were done using a jug set at 50, 200 and 40 rpm. The sedimentation time of the floc was 10 minutes. The initial turbidity ranges oscillated between 200 and 800 NTU, obtaining a removal of 89 % in relation to the average turbidity of 526.96 NTU. The best dose applied to the effluent was 200 mg/L of ferric trichloride and 0,8 mg/L of the cationic polymer flocculent MT-FLOC 4299. The contaminant removal parameters were: 84,97 % oils and fats; 82,55 % Biochemical Oxygen Demand; 79,36 % Chemical Oxygen Demand; 99,60 % suspended total solids; 96,67 % settleable solids and 75,65% total cyanide, thus complying with the Peruvian Regulations, so it is feasible to apply the treatment on a larger scale.

Key words: Coagulation, flocculation, wastewater, textile, wool washing.

INTRODUCCIÓN

Muchas son las industrias que generan aguas residuales que afectan la calidad del agua. Una de ellas es la industria textil de la ciudad de Arequipa, que en su proceso de lavado genera aguas residuales que contienen alto contenido de materia orgánica y sales inorgánicas, así como elevada DBO5 (demanda bioquímica de oxígeno), DQO (demanda química de oxígeno), grasas, sulfuros, y otros que dañan el sistema de alcantarillado, canales de regadío, generando riesgo potencial a la salud de las personas si se vierten sin tratamiento alguno¹.

El efluente textil es uno de los tipos de aguas residuales más peligrosas para el medio ambiente y la salud humana cuando se descarga sin el tratamiento adecuado². Esta industria consume grandes volúmenes de agua, aproximadamente 100 litros de agua por kilogramo de tela teñida^{3,4}.

Una de las alternativas para la mitigación de los efluentes de la industria textil de lana es la aplicación de tratamientos efectivos de bajo coste. El tratamiento fisicoquímico de

coagulación-floculación es un método alternativo frente a otros tratamientos que generan mayores gastos a las empresas, elevando los costos de producción en el tratamiento de sus aguas residuales^{5,6}.

Enríquez⁷, planteó una tecnología combinada de tratamiento anaerobio usando un reactor anaerobio de flujo ascendente y un reactor insuflado con aire, para tratar aguas procedentes del lavado de lana de oveja de la industria textil. Luego de combinar los dos tratamientos se obtuvieron porcentajes de remoción de 87,05 % demanda bioquímica de oxígeno DBO₅; 85,04 % demanda química de oxígeno DQO; 88,52 % sólidos totales suspendidos SST y 89,75 % aceites y grasas, cumpliendo con la normativa de la descarga de efluentes industriales. Se estudió el tratamiento de aguas residuales textiles a escala de laboratorio con los procesos: coagulación-floculación, biológico anaerobio y biológico aerobio, teniendo como resultado una remoción de más del 50 % de los parámetros de DQO total, DQO soluble, DBO₅ y color. Se observó que el coagulante Roquat-ATR produce una mejora en la eliminación de DQO, color y turbidez frente al cloruro ferroso⁸.

En la ciudad de Arequipa la mayoría de empresas de la industria textil no realizan el tratamiento adecuado a sus efluentes, motivo por el cual nuestro objetivo para la presente investigación fue evaluar el tratamiento fisicoquímico de los efluentes de lavado de lana provenientes de una industria textil de la ciudad de Arequipa con la finalidad de cumplir con los valores máximos admisibles (VMA) utilizando coagulante tricloruro férrico al 40 % y floculante polímero MT-FLOC 4299 al 0,1 %.

PARTE EXPERIMENTAL

Muestras de efluente textil

Se tomaron muestras compuestas de la matriz del agua residual de la industria textil ubicada en el parque industrial de Arequipa del proceso de lavado de lana por un tiempo de 24 horas. Se preservaron para análisis posterior de acuerdo al protocolo de monitoreo de efluentes aprobado por la RM N° 026-2000-ITINCI/DM⁹.

Se determinaron los parámetros físico-químicos DQO, DBO₅, TSS, aceites y grasas^{10,11,12,13} establecidos en el anexo 1 que recomienda la norma vigente DS N° 010-2019-VIVIENDA¹⁴ en el efluente.

Proceso de coagulación-floculación

Antes de empezar las pruebas experimentales con el efluente se procede a homogenizar la muestra con un agitador tipo mariposa por 10 minutos, según se indica en la figura 1.



Figura 1. (a) Muestra de efluente textil. (b) Homogenización de la muestra
Fuente: Elaboración propia.



Figura 2. (a) Detección de inhibidores. (b) Carga del efluente en equipo de prueba de jarras.
Fuente: Elaboración propia.

En la figura 2 se muestra la detección de aceites y grasas como posibles inhibidores de la coagulación - floculación, y el llenado del efluente textil en el equipo de prueba de jarras.

La muestra textil se caracterizó antes de realizar la prueba de jarras: temperatura 22,6°C, pH promedio 7,65 y turbidez en el rango de 200 a 800 NTU.

Para determinar el rango de dosis óptima del coagulante y floculante se realizaron pruebas preliminares durante dos semanas con tres repeticiones al día, contabilizando un total de 30 repeticiones en la prueba de jarras modelo Phipps & Bird digital programable.

Se ajustó la velocidad de las paletas de la prueba de jarras a 50 rpm para uniformizar la muestra. Después se dosificó el coagulante tricloruro férrico al 40 % a diferentes concentraciones con un tiempo de mezcla rápida de un minuto a 200 rpm según se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Dosificación preliminar de coagulante, FeCl₃ a 200 rpm.

Concentración	Tratamientos					
	1	2	3	4	5	6
FeCl ₃ 40% (mg/L)	120	160	200	240	280	320

Fuente: Elaboración propia.

Para estos seis tratamientos preliminares se redujo la velocidad de agitación de las paletas a 40 rpm por 15 minutos observando el tamaño de formación del floculo.

En la figura 3. (a) y (b) se observan los dosificadores y floculos mediante el índice de Willcomb, dejando sedimentar por 10 minutos.

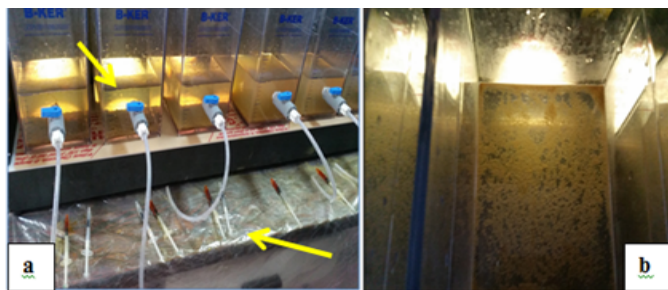


Figura 3. (a) Tamaño de floculo y dosificadores. (b) Formación del coágulo.

Fuente: Elaboración propia.

Para la determinación de la turbidez residual del agua decantada, se tomó la muestra directamente de los grifos de cada jarra y se expresaron en unidades nefelométricas de turbidez (NTU)^{15,16}. Se realizó la caracterización de los parámetros fisicoquímicos del agua tratada¹⁷, figura 4 (a) y (b).

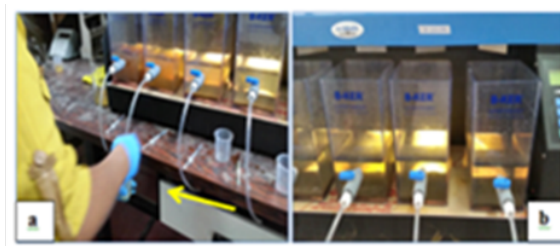


Figura 4. (a) Toma de muestra para determinación de turbidez y parámetros fisicoquímicos.

(b) Agua tratada. *Fuente: Elaboración propia.*

Después de determinar la dosis óptima del coagulante¹⁸, bajo las condiciones operacionales (número de líneas y tipo de compósito) se decidió extender el rango de coagulante y las concentraciones de floculante como se muestra en la tabla 2 manteniendo el sistema a 200 rpm/min y 40 rpm/15 min. En la tabla 2 se observan las concentraciones de coagulante y floculante propuestas.

Tabla 2. Dosis del coagulante: FeCl₃ al 40 % y floculante: MT-FLOC.

Concentración	Tratamientos		
	1	2	3
Coagulante: FeCl ₃ 40 %			
(mg/L) (Concentración)	200	220	240
(mL) (Volumen)	0,5	0,55	0,6
Floculante 0,1% (mg/L)			
(Concentración)	0,4	0,8	1,2
(mL) (Volumen)	0,2	0,4	0,6

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 5 se muestra los tratamientos por duplicado para dosis de coagulante y floculante (mL) (volumen).

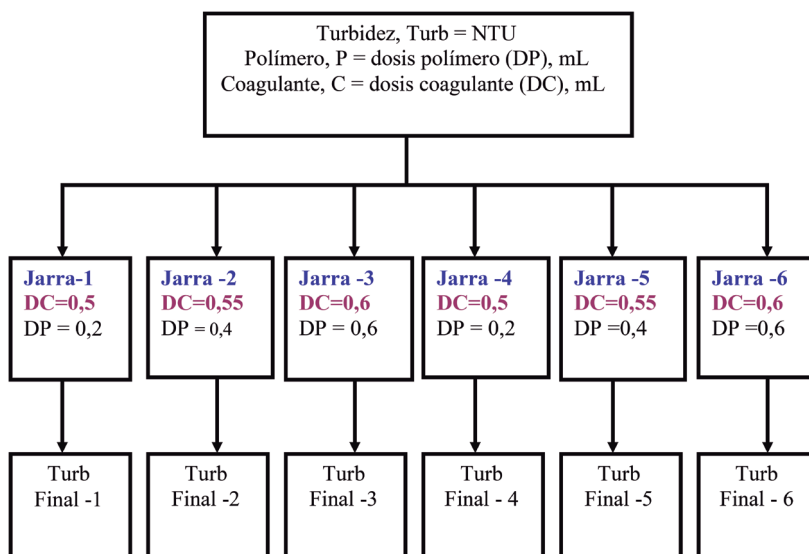


Figura 5. (a) Detección de inhibidores. (b) Carga del efluente en equipo de prueba de jarras.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 5 se observa un esquema de los tratamientos por duplicado, para las dosis de coagulante y floculante. Para cada dosis de floculante se realizaron cuatro repeticiones trabajando con tres dosis de coagulante óptimo en rango amplio.

Se trabajó en bloques y se observó que la dosis de rango amplio de coagulante manifestaba un mismo comportamiento, por lo que se tomó 0,5 mL como dosis óptima de coagulante. Con la dosis óptima se decidió ensayar las tres dosis (0,4; 0,8 y 1,2 mg/L) del floculante MT-FLOC 4299 como se indicó en la tabla 2.

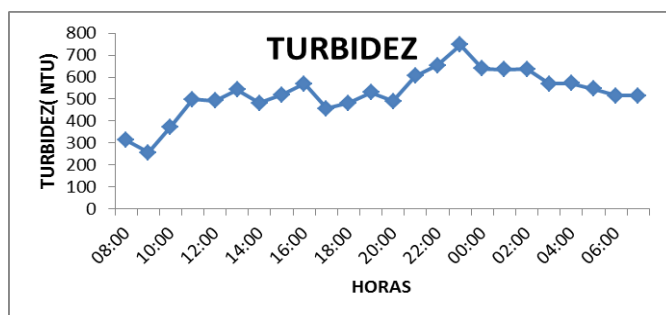


Figura 6. Turbidez durante 24 horas.

Fuente: Elaboración propia.

La figura 6 muestra el rango de turbidez inicial del efluente de lavado de lana medido durante un periodo de 24 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de dosis óptima del coagulante

La muestra de agua residual de lavado de lana mostró valores de turbidez en el rango de 200 a 800 NTU. Se evaluó el efecto que ejerce el coagulante durante dos semanas. Previo al tratamiento estadístico se realizó un análisis exploratorio con datos de turbidez menor, igual o mayor a 600 NTU. En la figura 7 se observa que el rango óptimo de la dosis del coagulante se encuentra entre los valores de 0,5 mL y 0,6 mL.

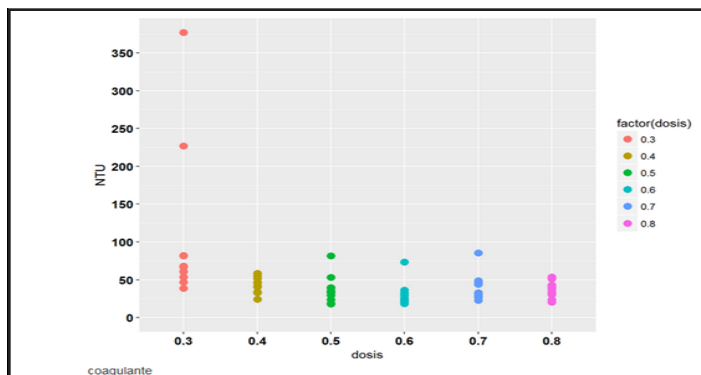


Figura 7. Turbidez final en cada nivel de coagulante.
Fuente: Elaboración propia.

Las comparaciones múltiples indican que existe un efecto similar en la reducción del nivel de turbidez cuando la dosis de coagulante es mayor que 0,5 mL (200 mg/L).

Dosis óptimas floculante y coagulante

El tratamiento estadístico fue en bloques (figura 8), ya que se extendió la dosis óptima de coagulante a 0,5 - 0,55 y 0,60 mL equivalente a 200; 220 y 240 mg/L con las dosis de floculante 0,2; 0,4 y 0,6 mL equivalente a 0,4; 0,8 y 1,2 mg/L (tabla 2).

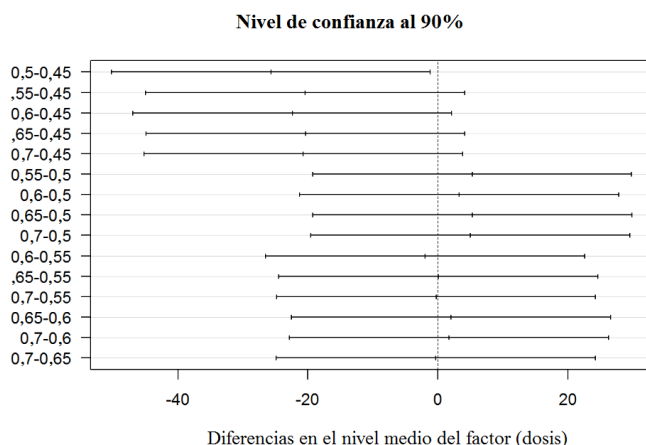


Figura 8. Prueba de Tukey.
Fuente: Elaboración propia.

En la figura 8 se muestra que la mayoría de comparaciones múltiples tienen el mismo comportamiento para el nivel de turbidez, excepto para la comparación de 0,5-0,45 según la prueba de Tukey.

Según la prueba estadística, las dosis adecuadas fueron de 200 mg/L de coagulante y 0,8 mg/L de floculante, obteniendo la mayor remoción para las aguas industriales de la industria textil.

La tabla 3 muestra parámetros medidos tanto para el efluente y para el agua tratada. Observamos que la demanda bioquímica de oxígeno y la demanda química de oxígeno, aceites y grasas manifiestan un alto grado de disminución, logrando un tratamiento eficiente con el coagulante y floculante evaluado^{18,19}. Se formó una cantidad mínima de espuma que no interrumpió el tratamiento. La medición de los sólidos suspendidos totales TSS nos indicó la eficiencia de la remoción y la medición de aceites y grasas¹⁷. Se determinó la presencia de inhibidores que fueron también removidos con el tratamiento realizado.

Tabla 3. Dosificación preliminar de coagulante, FeCl₃ a 200 rpm.

Parámetros	Unidad	AGUA	AGUA	VMA
		RESIDUAL	TRATADA	
Normativa Peruana				
Parámetros Físico Químicos				
Temperatura	°C	22,6	22,4	-
pH	pH	7,65	6,90	-
Turbidez	NTU	526,96	57,97	
Sólidos Totales Suspendidos	mg/L	608	<2,5	500
Sólidos Sedimentables	mL/L/h	3,0	<0,1	-
Parámetros Inorgánicos No Metálicos				
Cianuro Total	mg/L	0,0087	0,0021	1
Nitrógeno Amoniacal	mg/L	10,9	9,63	
Sulfuros	mg/L	0,0136	0,0107	
Aniones por Cromatografía Iónica				
Sulfatos, SO ₄ ²⁻	mg/L	295	278	
Parámetros Orgánicos				
Aceites y Grasas	mg/L	51,9	7,8	100
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	619	108	500
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	1407,9	290,6	1000
Metales				
Cromo Hexavalente	mg/L	<0,001	<0,001	0,5

Fuente: Elaboración propia.

CONCLUSIONES

La dosis óptima del coagulante FeCl₃ al 40 % fue de 200 mg/L y del floculante MT-FLOC de 0,8 mg/L, que fue determinante en la formación de flóculos más pesados, dando lugar a un incremento de la velocidad de sedimentación, obteniéndose una remoción del 84,97 % de grasas, 82,55 % de DBO₅, el 79,36 % de DQO y el 99,60 % de sólidos totales suspendidos. Es factible aplicar el tratamiento de coagulación-floculación en agua residuales de lavado de lana para disminuir los parámetros antes mencionados cumpliendo con la normativa, DS N° 010-2019- VIVIENDA.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa que financió el proyecto de investigación: “Tratamientos fisicoquímicos con métodos convencionales y avanzados de efluentes de la industria textil para el cumplimiento de los valores máximos admisibles (VMA) y su disposición al alcantarillado público”, con el número de contrato IBA-0019-2016.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guillén M.O. Tratamiento fisicoquímico de aguas de lavado de lana. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. [Tesis para optar el grado de Magister en Química]. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín; 2007.
2. Araújo CMB, Oliveira do Nascimento GF, Bezerra da Costa GR, Baptisttella AMS, Fraga TJM, de Assis Filho RB, et al. Real textile wastewater treatment using nano graphene-based materials: Optimum pH, dosage, and kinetics for colour and turbidity. *Can J Chem Eng.* 2020; 98(6): 1429-1440.
3. Crites T. Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones. Santa Fé de Bogotá, Colombia: McGraw-Hill Interamericana S.A.; 2000.
4. Seoáñez C M. Manual de las aguas residuales industriales. Primera Edición. Madrid, España: Editorial McGraw-Hill; 2012.
5. Pérez V. Optimización del tratamiento primario avanzado con diagramas de coagulación - floculación del afluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Canaveralejo. Cali: Escuela Universidad del Valle; 2005.
6. Rivas - Romero, Sorangel. Tratamiento por coagulación - floculación a efluente de la Empresa del Níquel Ernesto Che Guevara. *RTQ.* 2017; 37(2): 173-183.
7. Enríquez FP. Tratamiento de aguas residuales del lavado de lana de oveja en la industria textil mediante un sistema combinado de reactores anaerobio/aerobio. [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2018.

8. Perea MB. Estudio de tratabilidad de agua residual de industria textil a escala de laboratorio. [Tesis para optar el Título Ingeniero Técnico Industrial Especialidad en Química Industrial]. Santander: Universidad de Cantabria. Santander; 2012.
9. RM N° 026-2000-ITINCI/DM. Protocolos de monitoreo de efluentes líquidos y emisiones atmosféricas. [Internet]. Lima, Diario oficial El Peruano; 2000. [Consultado 7 ago 2018]. Disponible en: <https://www.legislacionambientalspda.org.pe/images/stories/normas/Pioner%20IV.%204.%20Industrial/4.%20Resoluciones%20ministeriales/Resolucion%20ministerial%20026-2000-ITINCI-DM.doc>
10. 5220 Chemical oxygen demand (COD). Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. doi: 10.2105/SMWW.2882.103
11. 5210 biochemical oxygen demand (BOD). Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. doi: 10.2105/SMWW.2882.102
12. 2540 Solids. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. doi: 10.2105/SMWW.2882.030
13. Method 1664, Revision B: n-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated n-Hexane Extractable Material (SGT-HEM; Non-polar Material) by Extraction and Gravimetry. [Internet]. [consultado 18 abril 2019]. Disponible en: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_1664b_2010.pdf
14. DS N° 010-2019-VIVIENDA. Reglamento de Valores Máximos Admisibles (VMA) para las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario. Diario oficial El Peruano [Internet]. 2019. [Consultado 5 may 2019]. Disponible en: <https://busquedas.elperuano.pe/download/url/decreto-supremo-que-aprueba-el-reglamento-de-valores-maximos-decreto-supremo-n-010-2019-vivienda-1748339-3>
15. MINAM. Estándares nacionales para la calidad ambiental del agua. DS. 002-2008-MINAM. [Internet]. [Consultado 12 mayo 2019]. Disponible en: http://www.minam.gob.pe/calidadambiental/wp-content/uploads/sites/22/2013/10/ds_002_2008_eca_agua.pdf
16. Sawyer CN, McCarthy PL, Parkin GF. Cuarta edición. Química para Ingeniería Ambiental. Bogotá: McGraw-Hill; 2011.
17. APHA-AWWA-WPCF. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. México: Ediciones Díaz de Santos S.A.; 1992. ISBN: 9788479780319
18. Degremont. Water Treatment Handbook. [Internet]. 2016. [consultado 10 abril 2019] Disponible en: <https://www.iagua.es/noticias/degremont/16/09/01/ya-esta-disponible-manual-tecnico-degremont-suez-version-digital>.
19. Labanda J, Llorens J. Wool scouring waste treatment by a combination of coagulation-flocculation process and membrane separation technology. Chem Eng Process Intensif. 2008; 47(7):1061–8.

USO DE CLORO ELECTROGENERADO A PARTIR DE NaCl EN MEDIO ÁCIDO COMO UNA PROPUESTA PARA LA LIXIVIACIÓN DE ORO ALUVIAL

Ulises Quiroz Aguinaga^a, Angélica María Baena Moncada^a,
Adolfo La Rosa-Toro Gómez^{*a}

RESUMEN

La electrogeneración anódica de cloro molecular, a partir de cloruro de sodio en una celda electrolítica, permite la producción de ácido hipocloroso en medio acuoso. Esta mezcla de cloruro y ácido hipocloroso actúa como lixiviante del oro aluvial hasta sus formas complejas, $[\text{AuCl}_2]^-$, $[\text{AuCl}_4]^-$. Las cantidades óptimas para la lixiviación de oro, empleando solo NaCl acuoso en medio neutro fue de 10 g L^{-1} , mientras que a pH 2, con una concentración fija de NaCl de 10 g L^{-1} la lixiviación de oro aumentó hasta en un 70,4%. El agregado de hipoclorito de sodio a una solución de cloruro de sodio a pH 2 demuestra que es el producto oxidado del cloruro el que cumple la función de oxidante y puede ser empleado exitosamente para recuperar oro de las arenas aluviales sin el empleo de mercurio.

Palabras clave: lixiviación ecológica, cloruro/hipoclorito, electrolixiviación, oro aluvial

USE OF CHLORINE ELECTROGENERATED FROM NaCl IN ACID MEDIUM AS A PROPOSAL FOR THE LEACHING OF ALLUVIAL GOLD

ABSTRACT

Anodic electrogeneration of molecular chlorine from sodium chloride in an electrolytic cell produces a hypochlorous acid solution in an aqueous medium. This mixture of chloride and hypochlorous was used to leach gold from alluvial ore to its complex forms, $[\text{AuCl}_2]^-$, $[\text{AuCl}_4]^-$. The optimal amounts of NaCl in a neutral medium for gold leaching was 10 g L^{-1} , while at pH 2, with a fixed NaCl concentration of 10 g L^{-1} it was observed a gold leaching increment of 70.4%. The addition of sodium hypochlorite to a solution of sodium chloride at pH 2 shows that it is the chloride oxidized product that performs the function of oxidant and can be used successfully for gold recovering from alluvial ore without the use of mercury.

Key words: ecological leaching, chloride / hypochlorite, electrowinning, alluvial gold

^a Laboratorio de Investigación de Electroquímica Aplicada (GIEA) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Rímac, Lima-Perú

* toro@uni.edu.pe

INTRODUCCIÓN

La producción de oro artesanal (oro aluvial) en el Perú está representado por los departamentos de Puno, Arequipa, Piura y Madre de Dios, principalmente. En dichos lugares la extracción de oro artesanal utiliza comúnmente mercurio para su amalgamación y posterior eliminación de este por medio de un calentamiento, lo que conlleva a que el mercurio se encuentre no solo en el aire, sino también en el agua y suelo¹.

El alto uso de mercurio en Madre de Dios, por parte de la minería artesanal formal e informal, principalmente, está afectando a las reservas naturales y está causando graves daños en la salud de los pobladores². Se estima que alrededor de 30 000 mineros artesanales hay en Madre de Dios en la actualidad¹.

En las últimas décadas se han realizado trabajos de investigación orientados a encontrar sustancias químicas alternativas al empleo de mercurio y/o cianuro para la extracción de oro. G. Senanayake *et al.*³ realizaron una revisión pormenorizada de las diferentes alternativas al cianuro para la lixiviación de oro, entre ellas se citan el empleo de la tiourea, el tiocianato, amoniaco y otros cuya toxicidad es evidente y en Perú se encuentra regulada por los Estándares de Calidad Ambiental (ECA). El uso de cloruro/hipoclorito para lixiviar oro data de antes de 1887, sin embargo, cayó en desuso debido a la corrosión asociada al cloruro, no obstante, hoy existen materiales que pueden eliminar este problema. Publicaciones de los últimos años, hacen referencia al empleo de cloruro-hipoclorito constituyéndose en una interesante propuesta no contaminante. El cloruro de sodio e hipoclorito han sido empleados para lixiviar oro de minerales conteniendo pirita, obteniendo cloruro aúrico⁴⁻⁷. La electrolisis de cloruro de sodio se ha utilizado para generar hipoclorito, logrando lixiviar oro de la amalgama de mercurio^{8,9}.

En este trabajo de investigación se ha realizado la lixiviación de oro aluvial a partir de la electrolisis de una solución de NaCl/NaClO a pH ácido logrando un porcentaje de recuperación del oro de 99,93 y 99,89 %.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparación de la muestra

La toma de muestra de la arena aluvial se realizó en la concesión minera “La Familia” del bajo Puquiri, perteneciente al departamento de Madre de Dios; el lugar se encuentra aproximadamente a cinco horas en vehículo desde Madre de Dios.

La muestra de arenilla de oro fue homogenizada por medio de roleo; operación que consiste en poner la muestra en una lona y luego tomar alternadamente la lona por las esquinas opuestas, con el propósito de mezclar las partículas. A continuación, se realizó el cuarteo de la muestra; operación que consiste en dividir en cuatro secciones y tomar dos al azar y proceder a mezclarlos, de esta porción se tomó la muestra para la realización de los ensayos

fisicoquímicos. La muestra obtenida fue llevada a una mesa gravimétrica para separar el contenido de oro de la arenilla y analizarlos por separado. Las partes se denominarán oro aluvial y arenilla. La relación de separación fue de 0,86 g Au Kg⁻¹ de arenilla aluvial tratada

Caracterización fisicoquímica de la muestra de arenilla

Se realizó la caracterización mineralógica de la muestra de arenilla para conocer los componentes del material en estudio y asociar posibles efectos inhibidores en el proceso de lixiviación. La caracterización se realizó mediante la visualización de la muestra usando una lupa estereoscópica trinocular Nikón SMZ-745T. Adicionalmente, se realizó un análisis mineralógico semicuantitativo de todos los minerales presentes (fases cristalinas) con un límite de detección (L.D.) de 1,00 %, a partir del procedimiento de validación del método por difracción de rayos X con Difractómetro D8 Advance Tubo Co (38kV, 25mA): KAlfa1: 6930.48eV KAlfa2: 1.7891 Å, Filtro: Kbeta: Ni.

Análisis de oro aluvial por ensayo químico

El análisis del oro aluvial se realizó por la metodología *Fire Assay* (Via Seca). Esta metodología, utilizada para la determinación cuantitativa de oro, consiste en mezclar la muestra con agentes fundentes que incluyen el óxido de plomo (litargirio) y que se funden a alta temperatura. El óxido de plomo se reduce a plomo, el cual colecta el metal precioso.

Cuando la mezcla fundida se enfría, el plomo permanece en el fondo, mientras que una escoria vítrea permanece en la parte superior. Los metales preciosos se separan del plomo mediante un procedimiento llamado copelación. El contenido de metal precioso colectado se procesa mediante digestión, sometiendo al regulo a un ataque ácido, se analiza mediante espectrómetro de absorción atómica.

Análisis de oro remanente en la arenilla

Para la determinación del contenido de oro remanente en la arenilla, el cual proviene de la separación previa de las partículas de oro empleando mesa gravimétrica, se analizó lixiviando el oro remanente con cianuro de sodio diluido, para este propósito se tomó una muestra de 100 g de arenilla a la cual se le adicionó 200 mL de una solución de 300 ppm de NaCN, se ajustó el pH al valor de 12 con adiciones de solución de NaOH 4 mol L⁻¹, posteriormente se agitó por 24 h y luego se dejó en reposo durante 72 h a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo, la solución se separó por filtración y una muestra fue analizada por espectrofotometría de absorción atómica (EAA).

Caracterización electroquímica - Estudio de la corrosión de oro patrón y parámetros de lixiviación

Caracterización electroquímica del oro patrón

Para los estudios de corrosión electroquímica del oro, se utilizó un disco de electrodo de oro patrón de 0,08 cm² de área, el cual fue limpiado previamente, tratando la muestra con ácido nítrico concentrado durante 5 min, posteriormente se lavó con agua destilada, para luego ser sumergido en una solución de H₂SO₄/H₂O₂, por último, se realizó un lavado con agua destilada.

Estudio de la electrolixiviación del oro patrón

Los estudios del comportamiento del oro en la solución lixiviante se realizaron empleando oro patrón (pureza 99,95 %). Los experimentos se llevaron a cabo en una celda de tres electrodos, utilizando como electrodo de trabajo el electrodo de oro patrón, como electrodo auxiliar un electrodo de grafito de elevada área superficial y como referencia un electrodo de Ag/AgCl saturado en KCl. Las medidas se realizaron utilizando un Potenciostato-Galvanostato PalmSens. Se utilizó como electrolito soporte Na_2SO_4 0.1 mol L^{-1} , la solución fue burbujeada previamente con gas nitrógeno durante 10 min a fin de eliminar el oxígeno disuelto. Las mediciones fueron realizadas empleando la técnica de voltamperometría cíclica en una ventana de potencial de 0 a 1,5 V vs Ag/AgCl y a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} . Durante las mediciones se realizaron adiciones sucesivas de NaCl desde 1000 a 10 000 ppm con el objetivo de medir los cambios frente al producto oxidado del cloruro, posteriormente se estudió el efecto del pH, adicionando alícuotas de HCl 1:1 para acondicionar el pH a valores de 2, 3, 4, 5 y 7 en cada medición.

La electrolixiviación de oro en el electrolito de NaCl/NaClO fue estudiado a diferentes valores de acidez. Para llevar a cabo este experimento se utilizó una solución de NaCl de 10 000 ppm y NaClO 40 000 ppm, a la cual se le adicionaron diferentes concentraciones de HCl diluido 1:1 para ajustar el pH a valores de 2, 3 y 4.

Se preparó una solución lixiviada de oro empleando muestras de oro patrón y oro de origen aluvial en solución de NaCl/NaClO ajustada a pH 2 sobre el cual se hizo los estudios de eficiencia de recuperación de oro.

Eficiencia de recuperación de oro patrón y de oro aluvial

Método químico: Precipitación

Se llevó a cabo estudios comparativos para estudiar la eficiencia de recuperación del oro patrón frente al oro de origen aluvial, empleando una solución de sulfato ferroso a pH 2 conteniendo 16 g L^{-1} , el pH se reguló con ácido fosfórico diluido 1:1. En la tabla 1 se muestra los datos de oro empleado en cada caso.

Tabla 1. Masas y volúmenes utilizados en la preparación de las disoluciones.

	Oro Patrón (99,95 %)	Oro Aluvial (80,76 %)
Masa (g) en solución	0.50047	0.57613
Volumen solución madre (mL)	100	100

El estudio de eficiencia en la recuperación de oro se realizó tomando muestras de 25 mL de la solución madre a las cuales se le agregó la cantidad necesaria de solución de FeSO_4 , en continua agitación para asegurar la completa precipitación de oro. El punto final se determinó por ausencia de precipitado en una muestra de solución sobrenadante, culminada esta etapa se dejó en agitación durante 30 min y luego en reposo por 2 h para permitir la aglomeración del oro precipitado y a continuación se procedió a separar y lavar en agua ultrapura el sólido mediante filtración. El oro recolectado se secó en una estufa a 120 °C durante 2 h, se pesó y almacenó. En la tabla 2 se muestran los datos del proceso.

Tabla 2. Datos utilizados en la precipitación del oro.

	Oro Patrón (99,95 %)	Oro Aluvial (80,76 %)
Concentración de solución (g mL ⁻¹)	0.0050047	0.0057613
Volumen de muestra utilizada (mL)	25	25
Volumen (mL) gastado de FeSO_4 (0.016 g mL ⁻¹)	32	36

Método electroquímico: Electrodeposición

En esta técnica se emplea una celda de dos electrodos sin compartimientos separados. Se utiliza un electrodo de acero inoxidable como cátodo de 2 x 2,5 cm de lado y un electrodo de grafito como ánodo inerte. La solución lixiviada se colocó en la celda bajo continua agitación en todo el proceso de electrolisis. Se utilizó una fuente de corriente con potencial regulable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica de la arenilla aluvial

El oro proveniente de la muestra de arenilla fue previamente separado mediante operación en mesa gravimétrica. En la figura 1A) se observa la muestra de arenilla, a la cual se le realizó la caracterización mineralógica para conocer los componentes mayoritarios. La caracterización se realizó mediante visualización de la muestra usando una lupa estereoscópica trinocular como se observa en la figura 1B), las características mineralógicas de los posibles componentes se presentan en la tabla 3.

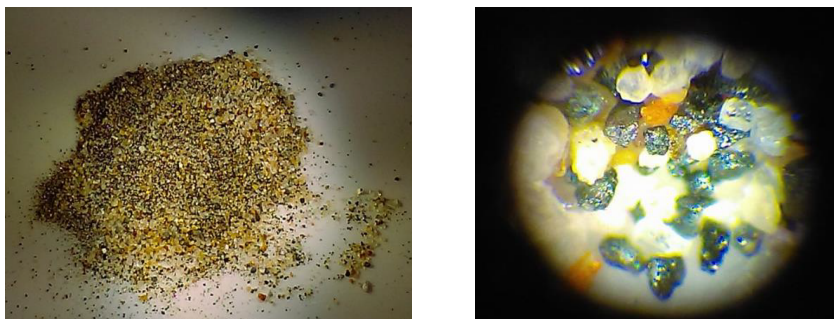


Figura 1. A) Muestra de arenilla. B) Imágenes de la muestra de arenilla con la lupa estereoscópica trinocular.

Tabla 3. Lista de posibles componentes en la muestra de arenilla.

Componente	Color
Cuarzo (SiO ₂)	Blanco
Magnetita (Fe ₃ O ₄)	Negro brillante
Malaquita (Cu ₂ CO ₃ (OH) ₂)	Verde
Calcita (CaCO ₃)	Blanco
Azufre	Amarillo
Otros	...

El análisis de la estructura y componente mineralógico semicuantitativo de la muestra fue analizada mediante difracción de rayos X (DRX), las líneas de difracción asociadas a los componentes mineralógicos se muestran en la figura 2. En la tabla 4 se presenta los resultados del análisis mineralógico expresado en porcentaje en masa relativa (g/g) de la muestra de arenilla.

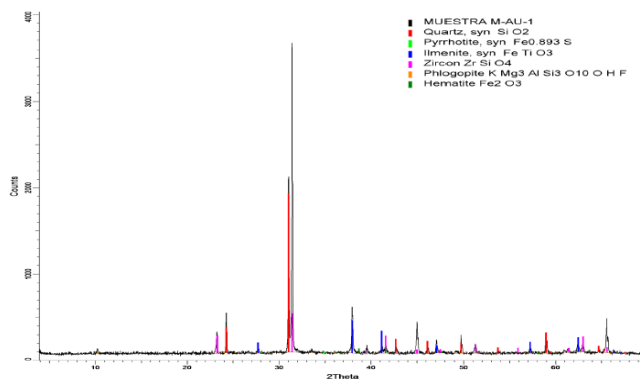


Figura 2. Difractograma de la muestra de arenilla.

Tabla 4. Resultado del análisis mineralógico por DRX de la muestra de arenilla.

Nombre del mineral	Fórmula general	Resultado aproximado (%)
Cuarzo	SiO ₂	44
Zircón	ZrSiO ₄	39
Ilmenita	FeTiO ₃	14
Hematita	Fe ₂ O ₃	1
Pirrotita	Fe _{1-x} S	1
Flogopita	KMg ₃ (Si ₃ Al)O ₁₀ (F,OH) ₂	<L.D

L.D.: Límite de detección

Análisis de oro aluvial por ensayo químico

El oro de origen aluvial, separado de la arenilla en mesa gravimétrica, fue analizado por la metodología *Fire Assay* (Vía Seca) resultando un contenido de oro de 80,76. Los resultados se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Resultado del análisis Fire Assay.

ID Muestras Lab	Elemento Químico
Elementos	Au
Unidades	%
LC Inf.	5
LC Sup.	150
Muestra	80,76

Análisis de oro remanente en la arenilla

La muestra de solución del lixiviado de oro cianurado se analizó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), obteniéndose un valor de 98 mg L⁻¹ de contenido de oro, en consecuencia, el oro remanente que queda en la arenilla después de la separación en mesa gravimétrica fue de 0.196 g kg⁻¹ de arenilla.

La eficiencia de separación de la mesa gravimétrica, considerando el oro total obtenido y el peso de arena aluvial tratado fue de:

0.196 g Au remanente en arena / (0.860+0.196) g (100) = 18.5 % Au no recuperado
 Eficiencia de separación de la mesa gravimétrica = 81.5 %

Caracterización electroquímica - estudio de la corrosión de oro patrón y parámetros de lixiviación

Caracterización electroquímica del oro patrón

Se utilizó un electrodo de oro patrón (99,95 %) el cual fue caracterizado electroquímicamente mediante voltamperometría cíclica en H_2SO_4 0.1 mol L^{-1} . En la figura 3 se muestra una voltamperometría típica de un electrodo de oro en medio ácido, en la cual se observa que a potenciales comprendidos entre 1.1–1.4 V aparece un hombro conformado por varios pequeños picos que se asocia a la formación de diferentes estados oxidados de oro, a potenciales superiores a 1.45 se descompone el agua formando oxígeno; aproximadamente a 1.0 V, en el barrido catódico se forma un pico intenso de reducción de los óxidos de oro [10].

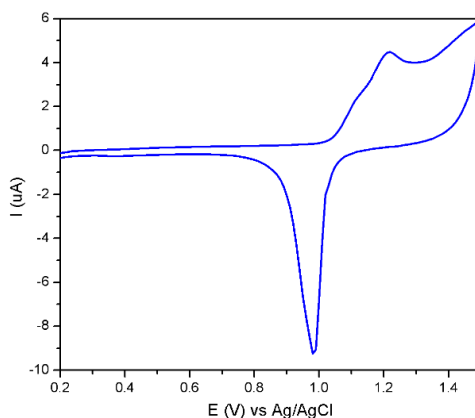


Figura 3. A) Muestra de arenilla. B) Imágenes de la muestra de arenilla con la lupa estereoscópica trinocular.

Estudio de la lixiviación electroquímica del oro en NaCl

En la figura 4 se muestran los voltamperogramas cíclicos del electrodo de oro en el electrolito soporte de Na_2SO_4 , al cual se le añade una solución de cloruro de sodio para establecer concentraciones de 1 a 10 g L^{-1} . Los experimentos fueron realizados empleando el electrodo de referencia de Ag/AgCl previo burbujeo de nitrógeno durante 10 min.

Las respuestas voltamperométricas observadas en la figura 4 muestran el comportamiento típico de un fenómeno de lixiviación electroquímica del oro, el continuo crecimiento de la corriente es asociada a la cantidad de ion cloruro añadido mostrando la dependencia de la velocidad de electrolixiviación con la concentración de cloruro. El mecanismo de reacción ha sido discutido por J. Arvia *et. al*^[1], concluyendo que los productos anódicos son Au(I) y Au(III) dependiendo de la concentración y potencial de oxidación empleado, el mecanismo se ve favorecido por la espontánea adsorción del ion cloruro sobre el electrodo de oro. El

último paso (Ec.3), muestra la desproporción espontánea del complejo $3(AuCl_2^-)_{ad}$ para formar la especie $AuCl_4^-$ estabilizándose en la solución. Las ecuaciones que la describen son:

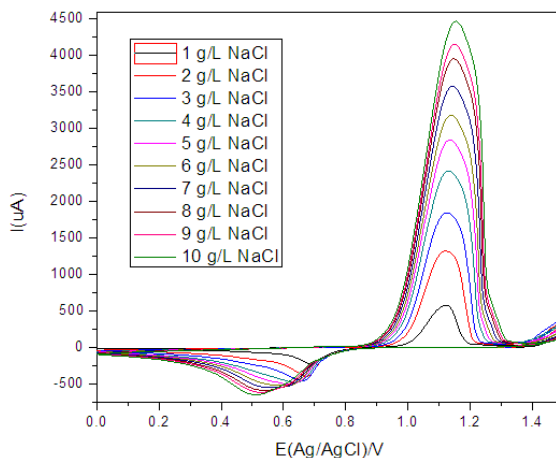
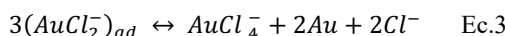


Figura 4. Voltamperometría cíclica del electrodo de oro en electrolito de $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$, con variación de concentración de NaCl de 1 g L^{-1} a 10 g L^{-1} . $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$

Estudio de la lixiviación electroquímica influenciada por el pH

En la figura 5 se muestran las voltamperometrías cíclicas del oro en el sistema NaCl y a valores de pH variable de 2,3,4,5,7 ajustados, añadiendo HCl 1:1 y en electrolito de NaCl 10 g L^{-1} . El gas de cloro en sus disoluciones acuosas también actúa formando tres especies oxidantes, dependiendo del pH en el que se encuentren: cloro acuoso ($\text{Cl}_{2(ac)}$), ácido hipocloroso (HOCl) e iones hipoclorito (ClO^-). Estas especies se pueden generar por la adición de hipoclorito de sodio (NaOCl) en solución¹², estas sales se ionizan en agua, bajo condiciones ácidas ($\text{pH} < 7.5$) el ion hipoclorito se convierte en ácido hipocloroso. En condiciones muy ácidas ($\text{pH} < 3.5$) y en presencia de iones cloruro, se forma cloro acuoso. Todas las especies de cloro son potentes oxidantes pero el HOCl es el más eficaz. Por lo tanto, el pH debe ser mantenido en una gama de estabilidad del HOCl¹³. En la figura 5 se observa que el pico de corrosión para el oro en aproximadamente 1.2 V presenta mayor corriente de corrosión cuando el pH igual a 2. Por otro lado, se observa también que a pH igual a 7 se tiene una buena corrosión del oro, permitiendo lixiviar el oro en condiciones neutras a costa de disminuir la velocidad.

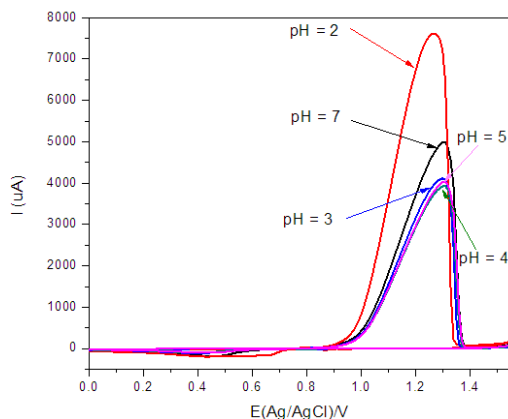


Figura 5. Voltamperometría cíclica para el Au/V en el sistema NaCl–HCl. Concentración de NaCl de 10 g L⁻¹ a pH 2, 3, 4, 5 y 7. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, último ciclo.

En la figura 6 se muestran las voltamperometrías cíclicas del oro en el sistema NaCl–HCl–NaClO en presencia de N₂, teniendo como concentración fija de NaCl 10 g L⁻¹ y NaClO 40 g L⁻¹ a la cual se adicionó cantidades de HCl concentrado para adecuar el pH a 4, 3 y 2.

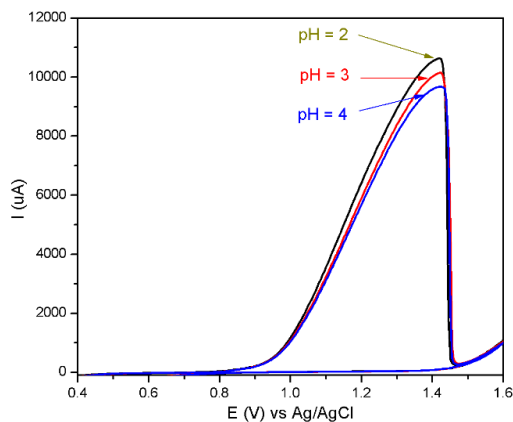
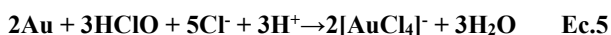
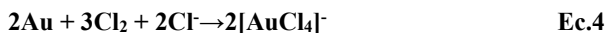


Figura 6. Voltamperometría cíclica para el Au/V en el sistema NaCl–NaClO–HCl. Concentraciones de NaCl de 10 g L⁻¹, NaClO de 40 g L⁻¹ a pH 2, 3 y 4. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, último ciclo.

En este caso, el electrolito base contiene una cantidad importante de NaClO que le permite lixiviar químicamente el oro, de tal modo que la electrolixiviación actúa simultáneamente a la reacción química obteniendo una mayor velocidad neta. En este caso la corriente asociada a pH 2 es de 10.7 mA comparado con el valor de 7.7 mA en ausencia de NaClO (figura 5)

Las reacciones químicas de lixiviación de oro pueden ser escritas¹⁴:



Eficiencia de recuperación de oro patrón y de oro aluvial

El oro patrón y el oro aluvial fueron lixiviados químicamente utilizando NaCl 10 000 ppm, NaClO 40 000 ppm y ácido fosfórico a pH 2. La solución lixiviada resultado del proceso de disolución de oro aluvial mostró al final residuos sólidos y cierta turbidez, el cual se separó por filtración.

Las soluciones que contenían el oro aluvial y el oro patrón disueltas fueron tratadas con FeSO₄, hasta precipitación total del oro. El oro obtenido fue secado a 120 oC durante 2 h y se pesó comparándolo con el oro pesado inicialmente. En la tabla 6 se muestran los datos del proceso. El procedimiento presentado para la recuperación de oro aluvial nos reporta un valor de 99,89 % de recuperación.

Tabla 6. Masas y porcentaje de eficiencia de oro patrón y oro aluvial.

	Oro Patrón	Oro Aluvial
Masa de oro inicial (g)	0.12512	0.14403
Ley del oro	99.95 %	80.76 %
	0.12505	0.11632
Masa de oro recuperado (g)	0.12503	0.11620
% Eficiencia de recuperación	99.93	99.89

Recuperación vía electroquímica

La electrólisis para la electrodeposición de oro se realizó aplicando una densidad de corriente de 10 mA cm⁻² en agitación continua durante 1 h. Se logró recuperar el 93,52% del contenido de oro. Los datos obtenidos antes y después del proceso de lixiviación se observan en la tabla 7.

Tabla 7. Masas y porcentaje de eficiencia de la electrodeposición de oro.

Parámetro	Resultado
Masa de placa de acero inicial (g)	29.16152
Masa de oro recuperado (g)	29.24764
Masa de oro recuperado (g)	0.08812
% Eficiencia de electrodeposición	93.52

CONCLUSIONES

La arena aluvial muestreada en la concesión minera “La Familia” del bajo Puquiri presenta un contenido mineralógico constituido principalmente de cuarzo, zircón, ilmenita y otros constituyentes de óxidos hierro. El concentrado tiene un contenido de oro de 0,86g kg-1 de arena aluvial y la ley es de 86,76 %. La mesa gravimétrica logra separar hasta el 81,5 % del oro dejando en la arena 18,5 % de oro en forma de partículas finas. Los estudios electroquímicos de lixiviación del oro de la arena aluvial empleando una solución de NaCl solo y NaCl/NaClO combinado muestra que el hipoclorito tiene un fuerte poder oxidante capaz de lixiviar químicamente el contenido de oro de las arenas aluviales.

Los ensayos comparativos de recuperación de oro de la solución lixiviada de oro (oro patrón y oro aluvial) empleando solución de sulfato ferroso en medio ácido, muestran una alta eficiencia, recuperándose entre 99,93 y 99,89 % del contenido de oro, respectivamente. La escasa diferencia de ambos valores muestra que no existe inhibidores químicos en los minerales que acompañan al oro en las arenas aluviales. La recuperación de oro también es posible mediante electrodeposición de la solución lixiviada, sin embargo, para lograr una eficiencia equivalente a la obtenida en la precipitación química se debe emplear un exceso de hasta dos veces la carga estequiométricamente necesaria para su recuperación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a CIENCIACTIVA, CONCYTEC y FONDECYT por el apoyo financiero otorgado para el desarrollo de esta investigación a través del proyecto FONDECYT Contrato 209-2015

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yard EE, Horton J, Schier JG, Caldwell K, Sanchez C, Lewis L, et al. Mercury exposure among artisanal gold miners in Madre de Dios, Peru: a cross-sectional study. *J Med Toxicol.* 2012; 8 (4): 441–448.
2. Swenson JJ, Carter CE, Domec JC, Delgado CI. Gold Mining in the Peruvian Amazon: Global Prices, Deforestation, and Mercury Imports. *PloS One.* 2011; 6 (4): e1875. doi: 10.1371/journal.pone.0018875.
3. Senanayake G. Gold leaching in non-cyanide lixiviant systems: critical issues, on fundamentals and applications. *Miner Eng.* 2004; 17: 785–801.
4. Ghobeiti Hasab M, Rashch F, Raygan Sh. Chloride–hypochlorite leaching and hydrochloric acid washing in multi-stages for extraction of gold from a refractory concentrate. *Hydrometallurgy.* 2014; 142: 56–59.
5. Tran T, Lee K, Kapila F. Halide as an alternative lixiviant for gold processing—an update. En: Young CA, Twidwell LG, Anderson CG. Meeting, Cyanide: where to from

- here; 2001; New Orleans, LA. Pittsburgh, PA: The Minerals Metals & Metal Society; 2001. P. 501-508.
6. Soo Na K, Hi Jung B, Woong J, Jun Ha T, Tran T, Jun Kim M. Use of chloride–hypochlorite leachants to recover gold from tailing. *Int J Miner Process.* 2008; 86: 131–140.
 7. Ghobeiti Hasab M, Raygan S, Rashchi F. Chloride–hypochlorite leaching of gold from a mechanically activated refractory sulfide concentrate. *Hydrometallurgy.* 2013;138: 59–64.
 8. Ghobeiti Hasab M, Rashchi F, Raygan S. Simultaneous, sulfide oxidation and gold leaching of a refractory gold concentrate by chloride–hypochlorite solution. *Miner Eng.* 2013; 50–51: 140–142.
 9. de Andrade Lima LRP, Bernardez LA, Barbosa LAD. Characterization and treatment of artisanal gold mine tailings. *J Hazard Mater.* 2008; 150(3): 747-753.
 10. Ma W, Lun Ying Y, Xia Qin L, Gu Z, Zhou H, Wei Li D, et al. Investigating electron-transfer processes using a biomimetic hybrid bilayer membrane system. *Nat Protocol.* 2013; 8: 439–450.
 11. Herrera Gallego J, Castellano CE, Calandra AJ, Arvia AJ. The electrochemistry of gold in acid aqueous solutions containing chloride ions. *J Electroanal Chem Interf Electr* 1975; 66(3): 207-230.
 12. Puvvada GVK, Murthy DSR. Selective Precious Metals Leaching from a chalcopyrite Chloride/Hypochlorite Media. *Hydrometallurgy.* 2000; 58: 185-191.
 13. Black and Veatch Corporation. White's handbook of chlorination and alternative disinfectants, 5th Edition. New York: John Wiley & Sons; 2010. p. 68–131.
 14. Baghalha M. Leaching of an oxide gold ore with chloride/hypochlorite solutions. *Int J Miner Process.* 2007; 82: 178-186.

ENSEÑANZA DE LA QUÍMICA**UNA APROXIMACIÓN A LA TAUTOMERÍA DE LOS
HETEROCICLOS AROMÁTICOS**

José Elguero

Instituto de Química Médica (C.S.I.C.), Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid

RESUMEN

Esta revisión presenta de una manera sencilla el universo de la tautomería de los compuestos heterocíclicos aromáticos. Se llama la atención sobre los errores más frecuentes y se dan algunas indicaciones de como proceder en el estudio de la tautomería.

Palabras clave: tautomería, autotropía, prototropía, enlaces de hidrógeno, aromaticidad

**A SIMPLE APPROACH TO THE TAUTOMERISM
OF AROMATIC HETEROCYCLES****SUMMARY**

This review summarizes in a simple way the tautomerism of heterocyclic aromatic compounds. Attention is drawn to the most frequent errors and some indications are given on how to proceed in the study of tautomerism.

Key words: tautomerism, autotrope, prototropy, hydrogen bonds, aromaticity

Introducción

El decálogo de la tautomería

- I. No confundir mesomería y tautomería
- II. No olvidar un tautómero por minoritario que sea
Energía libre y porcentajes de tautómeros a y b
Tautomería y reactividad
Tautomería y equilibrio ácido-base
- III. En general, hay equilibrio entre dos tautómeros aun cuando sean idénticos.
- IV. Se debe llamar al compuesto usando el nombre del tautómero más abundante
- V. No olvidar los aspectos dinámicos de la tautomería
¿Se pueden separar dos tautómeros?
El uso de la HPLC dinámica

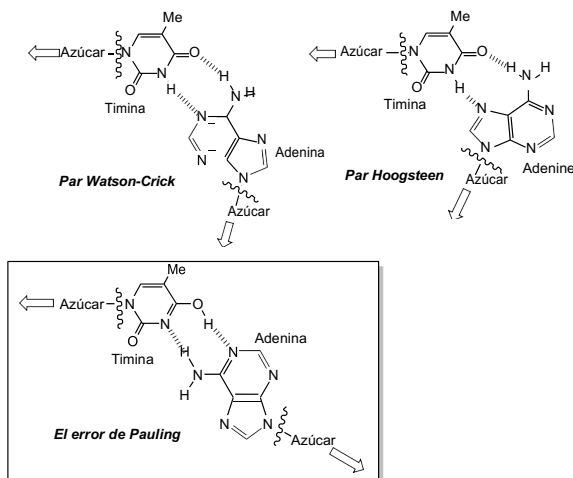
- VI. Hay tautomerías no prototrópicas
 - Acilotropías
 - Metilotropías
 - Aptitud migratoria de sustituyentes X unidos al nitrógeno
 - Clorotropías
 - Metalotropías
- VII. Tautomería y estado físico
 - ¿Hay prototropía en fase gas?
 - ¿Hay prototropía en estado sólido?
 - Tautomería y rayos X
- VIII. El universo tridimensional de la tautomería
 - Efecto de los enlaces de hidrógeno sobre la posición del equilibrio
 - Efecto de los enlaces de hidrógeno sobre la constante de velocidad k
 - Tautomería y química teórica
- IX. ¿Como determinar KT?
- X. Tautomería y aromaticidad

Conclusión

Referencias

INTRODUCCIÓN

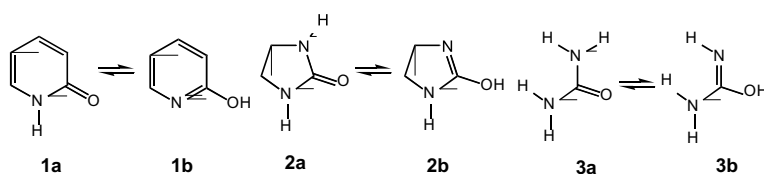
No es posible ser químico orgánico sin haber, en algún momento, tropezado con un problema de tautomería. Ello es aún más cierto en química heterocíclica lo cual explica por qué varios libros le han sido dedicados [1,2,3,4]. Se cuenta que Pauling perdió la carrera para determinar la estructura del ADN frente a Watson y Crick porque utilizaba para la timina un tautómero erróneo (la forma hidroxí) lo que le conducía a un ángulo demasiado abierto para los azúcares (Esquema 1).



Esquema 1. Tautomería y estructura del ADN.

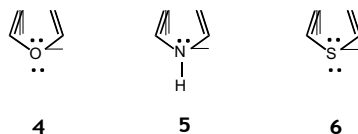
Conceptualmente, el problema se puede considerar resuelto en el sentido de que disponemos de los conocimientos necesarios para explicar toda observación e incluso para predecir el comportamiento tautomérico de cualquier sustancia. Sin embargo, es frecuente leer hoy día publicaciones (ya aparecidas o como evaluadores) y escuchar conferencias donde se cometen graves errores sobre la tautomería. Por ello nos ha parecido útil presentar de una manera sencilla la tautomería de los compuestos heterocíclicos insistiendo en los aspectos generales.

Vamos a limitarnos a compuestos aromáticos, por ejemplo **1a/1b**, ya que la tautomería de los compuestos no aromáticos, como **2a/2b** es muy parecida a la de los compuestos alicíclicos **3a/3b** (Esquema 2). Hay un efecto de anillo pero es débil y puede ser despreciado, en primera aproximación.



Esquema 2. Compuestos aromáticos, no-aromáticos y alicíclicos.

Hay que empezar por definir lo que se entiende por compuesto aromático. En lo que aquí nos atañe, basta con adoptar la regla de Hückel ^[5,6]: un compuesto cíclico es aromático si posee $4n+2$ electrones π (en la mayoría de casos, $n = 2$). Hay que añadir la extensión de Robinson ^[7]: los pares libres de los heteroátomos pueden participar en la aromaticidad contribuyendo con dos electrones al sexteto aromático. Es el caso del furano **4**, del pirrol **5** y del tiofeno **6** (Esquema 3). Observemos que en los casos de **4** y de **6**, queda otro doblete no utilizado que puede participar en la reactividad.

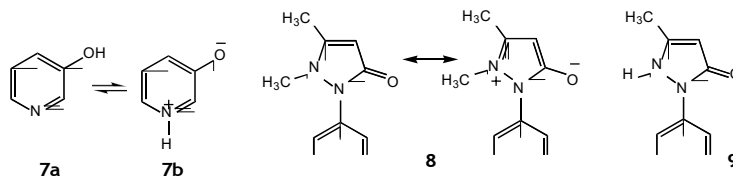


Esquema 3. Heterociclos aromáticos con seis electrones π .

Regla:

Un compuesto heterocíclico debe ser considerado aromático si tiene al menos un tautómero que lo es.

La 3-hidroxipiridina **7a** es aromática ya que la piridina lo es. Su tautómero **7b**, que es una betaína para la cual no se puede escribir una forma de resonancia neutra, también lo es. La antipirina **8** es aromática ya que se puede escribir una forma de resonancia cargada que lo es. El compuesto **9** también lo será (Esquema 4).



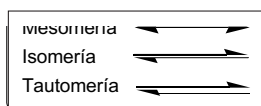
Esquema 4. Heterociclos aromáticos con seis electrones π .

Dado el enorme número de publicaciones que describen resultados sobre la tautomería, es necesario ordenar todos esos resultados y condensarlos en un número pequeño de reglas claras y generales, que denominaremos "El decálogo de la tautomería" (Esquema 5).

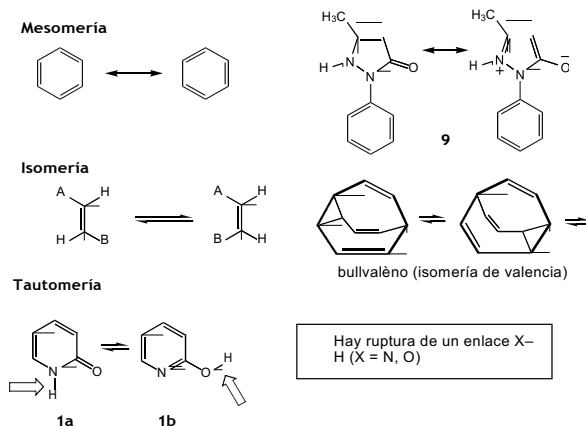
- I. NO CONFUNDIR MESOMERÍA Y TAUTOMERÍA.
- II. NO OLVIDAR UN TAUTÓMERO POR MINORITARIO QUE SEA.
- III. EN GENERAL EXISTE UN EQUILIBRIO ENTRE DOS TAUTÓMEROS INCLUSO SI SON IDÉNTICOS.
- IV. SE DEBE NOMBRAR EL COMPUESTO UTILIZANDO EL TAUTÓMERO MÁS ABUNDANTE.
- V. LA TAUTOMERÍA NO ES SÓLO EQUILIBRIO: NO OLVIDAR LOS ASPECTOS DINÁMICOS.
- VI. HAY TAUTOMERÍAS NO-PROTOTRÓPICAS.
- VII. TAUTOMERÍA Y ESTADO FÍSICO.
- VIII. EL UNIVERSO TRIDIMENSIONAL DE LA TAUTOMERÍA.
- IX. ¿CÓMO DETERMINAR K_T ?
- X. TAUTOMERÍA Y AROMATICIDAD.

Esquema 5. El decálogo de la tautomería.

I. No confundir mesomería y tautomería.



En la mayoría de los casos es fácil distinguir las dos situaciones. *¡No se debe nunca confundir la doble flecha de los equilibrios (isomería, tautomería) con la flecha de dos puntas de la resonancia!*

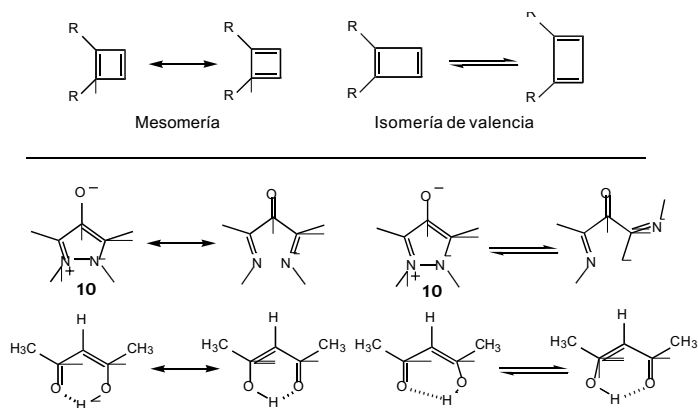


Esquema 6. Ejemplos sencillos de mesomería (o resonancia) y equilibrio.

Empecemos con ejemplos sencillos. En el Esquema 6 hemos representado tres casos. Como ejemplos de mesomería, el benceno y una pirazolinona. Como ejemplos de isomería, el caso de las olefinas *E/Z* (sin ruptura de enlaces) y el caso del bullvaleno (donde hay más de 1.200.000 isómeros ($10! / 3$) con ruptura y formación de enlaces C-C. Finalmente, el caso paradigmático de la 2-piridona en la cual un enlace X-H (N-H u O-H) se rompe o se forma.

Hay casos más sutiles. Ello se debe al carácter impreciso ("fuzzy") de las definiciones químicas. En el Esquema 7, hemos representado algunos ejemplos. Hay que recordar que la resonancia sólo implica los electrones: **los núcleos deben permanecer en el mismo sitio** (relacionado con la aproximación de Born- Oppenheimer [8]).

Consideremos el caso del ciclobutadieno. Si la molécula fuese cuadrada, las formas de la derecha y de la izquierda serían formas de resonancia de un producto único. Dado que la molécula es rectangular, las dos formas son diferentes (isomería) y, según la naturaleza de R, la de la izquierda o la de la derecha, será más estable. Incluso cuando R = H, en que ambas formas tienen la misma energía, están en equilibrio dinámico: por ejemplo, en RMN, se puede observar una única señal promedio para los 4 protones (eso depende de la barrera energética y de la temperatura).



Esquema 7. Ejemplos más sutiles de resonancia y de tautomería.

Fijémonos ahora en la betaína que deriva de una pirazol-4-ona **10**. Sin mover los núcleos, se puede escribir una forma de resonancia neutra: la estructura real es intermedia entre esas dos estructuras, pero no necesariamente una media 50:50, ya que eso depende del peso de cada una de ellas. Si, por el contrario, los núcleos cambian de sitio, entonces se trata de un equilibrio, de un ejemplo de isomería.

Finalmente, examinemos el caso del enol de la acetilacetona. Si el protón del puente de hidrógeno $O \cdots H \cdots O$ está justo en medio, entonces se trata de un producto único con dos formas mesómeras idénticas. Pero, si como ocurre realmente, el enlace $O-H$ es más corto que el enlace $O \cdots H$, entonces se trata de dos tautómeros idénticos. Una vez más, insistamos en que aún teniendo la misma energía, están en equilibrio dinámico. Un pequeño cambio, por ejemplo cambiar un CH_3 por un CH_2D , basta para hacerlos diferentes.

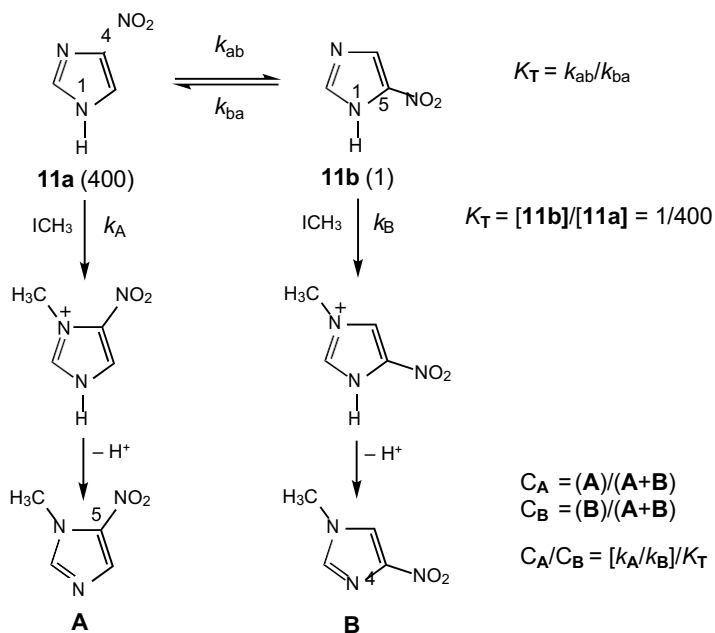
II. No olvidar un tautómero por minoritario que sea.

En matemáticas, 0 es diferente de 10^{-n} , pero para un químico, más allá de un cierto valor de n , 10^{-n} es considerado como nulo. Esa simplificación puede conducir a errores.

$$0 \neq 0,001$$

Sea el 4(5)-nitroimidazol **11**. Se ha determinado experimentalmente que la relación 4- NO_2 /5- NO_2 es de 400/1, luego $K_T = [11b]/[11a] = 0,0025$. Se cometerá un grave error despreciando el tautómero 5-nitro porque hay poco, ya que **frecuentemente el tautómero menos abundante es el más reactivo** (esto está relacionado con el postulado de Hammond [9]).

Así la relación de los productos de *N*-metilación, A et B, depende no sólo de la constante de equilibrio K_T , sino también de las constantes de velocidad k_A y k_B (Esquema 8) que son, en general, más diferentes entre ellas que no lo son las constantes de velocidad de tautomería k_{ba} y k_{ab} .



Esquema 8. Metilación del 4(5)-nitroimidazol.

Energía libre y porcentaje de tautómeros a y b.

Acabamos de describir un ejemplo de constante de equilibrio $K_T = [11b]/[11a] = 0,0025$, es decir, 99,75 % de **11a** y 0,25 % de **11b**. Eso nos conduce a hacer una observación y a señalar una precaución. Muchas técnicas instrumentales utilizadas para estudiar los equilibrios tautómeros son incapaces de determinar la existencia de un tautómero presente en tan pequeña cantidad.

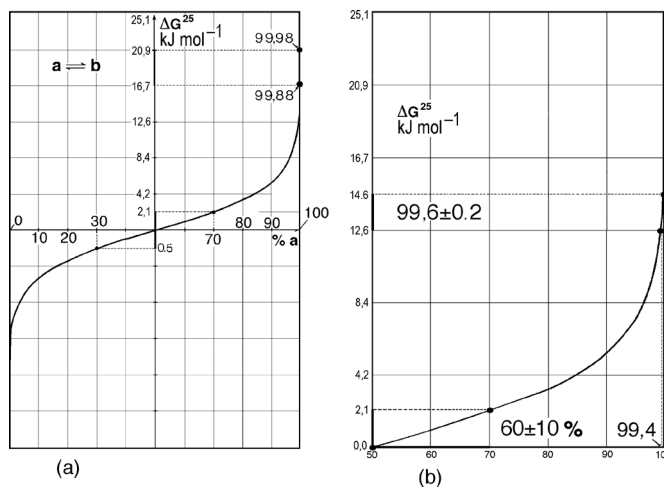


Figura 1. (a) Representación de $\Delta G^{298,15}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) en función del porcentaje de tautómero **a** (**b** = 100–**a**). (b) Variación del error sobre $\Delta G^{298,15}$ en función del error sobre el porcentaje.

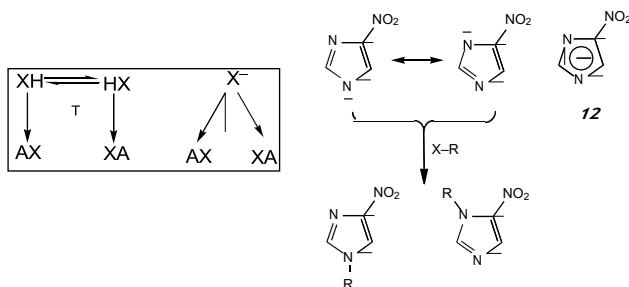
Por ejemplo, consideremos la RMN de ^1H . Se puede estimar su límite de sensibilidad al 1-2%. Es decir, que no puede diferenciar una mezcla 98:2 de una 99:1. Eso lleva a creer erróneamente que el método es más preciso en las regiones próximas a 50:50 que en los extremos. En realidad, como lo muestra la Figura 1a, la diferencia de energía es la misma ($4,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) cuando se pasa de 30% a 70% que cuando se pasa de 99,88% a 99,98%. Lo que tiene sentido físico es ΔG^{25} ($25 \text{ }^\circ\text{C} = 298,15 \text{ K}$), magnitud teóricamente calculable (así como ΔH). La Figura 1a es una representación de ΔG^{25} en función del % de tautómero **a**. La Figura 1b ilustra el hecho de que el mismo error sobre ΔG^{25} , $2,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, tiene un efecto muy diferente sobre el error en porcentaje: en la parte central eso se traduce por $60 \pm 10\%$, mientras que en un extremo, eso corresponde a $99,6 \pm 0,2\%$.

En conclusión, aunque en la práctica cotidiana, se continúen utilizando los porcentajes, **en todos los casos hay que transformarlos primero en K_T y luego en ΔG ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$)**.

Tautomería y reactividad.

Un error grave, aún muy frecuente, es discutir las reacciones de alquilación en medio básico en función del equilibrio tautómero. En medio básico, la entidad que reacciona es la base conjugada **12** (Esquema 9). Es evidente que su reactividad no tiene relación directa con la tautomería de **11** (Esquema 8).

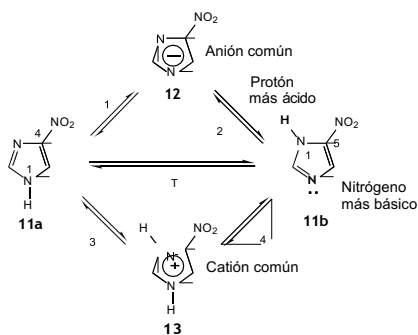
XH y HX representan dos tautómeros cualesquiera, siendo X la molécula con el protón tautomerizable en dos posiciones diferentes.



Esquema 9. Alquilación del anión nitroimidazolato.

Tautomería y equilibrio ácido-base.

Vamos a continuar usando el 4(5)-nitroimidazol para ilustrar la relación entre tautomería y equilibrio ácido-base, bien ácido (pérdida del protón), bien básico (ganancia de un protón) (Esquema 10).

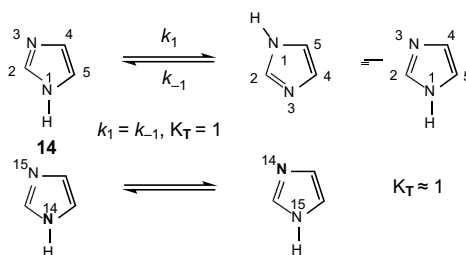


Esquema 10. Acidez y basicidad del 4(5)-nitroimidazol.

El tautómero **11b** es a la vez el más ácido y el más básico. Por esa razón el equilibrio está desplazado hacia **11a**. Se conoce con el nombre de paradoja de Gustafson el hecho de que el **tautómero más ácido sea el menos abundante** [10].

III. En general, hay equilibrio entre dos tautómeros aun cuando sean idénticos.

A pesar de que es evidente, se trata de un aspecto que origina frecuentes confusiones. En parte están relacionadas con una antigua tradición de los químicos heterocíclicos de girar la molécula en el plano del papel después de la transferencia del protón. Sea, por ejemplo, el caso del imidazol **14** (Esquema 11).



Esquema 11. La tautomería "autotropa" o "degenerada" del imidazol.

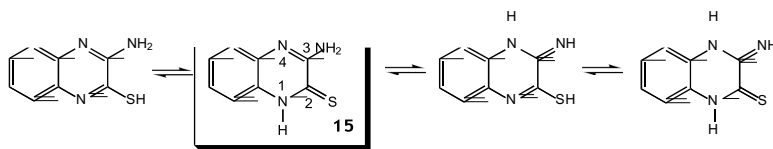
Cuando el protón "salta" de la posición 1 a la posición 3, se obtiene de nuevo el imidazol que se suele representar con la fórmula de arriba a la derecha que no se puede diferenciar de la de la izquierda. Por dicha razón, esta tautomería de los anillos ("anular") se llama "autotropa" o "degenerada" ya que los estados inicial y final tienen idénticas energías.

Para recordar que se trata de dos tautómeros, se puede reemplazar un átomo de ^{14}N por uno de ^{15}N : se observa que se trata de dos compuestos diferentes (la constante de equilibrio ya no es = 1, sólo cercana a 1, debido al efecto isotópico).

Conclusión: no hay que imaginar el imidazol en solución como una molécula única sino como dos moléculas en equilibrio rápido (ver sección V).

IV. Se debe llamar al compuesto usando el nombre del tautómero más abundante

Se debe seguir esta regla en todos los casos en los que se sepa que hay un tautómero predominante. Por ejemplo, se debe hablar de la 3-amino-2(1*H*)-quinoxalin-2-tiona **15** ya que es el más estable de los cuatro tautómeros (Esquema 12). Si dos tautómeros son de energía similar, entonces los dos nombres son aceptables.

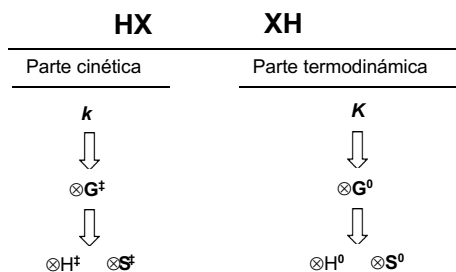


Esquema 12. El tautómero más estable da su nombre a la molécula.

V. No olvidar los aspectos dinámicos de la tautomería

Aunque la mayoría de las publicaciones sobre tautomería conciernen los equilibrios, los aspectos dinámicos tienen mucho interés. Como la RMN de ^1H es la herramienta más utilizada para estudiar la tautomería, la explicación del olvido en dicho caso es múltiple:

- Es mucho más fácil utilizar la RMN a temperatura ambiente (incluso si se estudian efectos de disolvente o efectos de concentración) que a temperatura variable, sobre todo a baja temperatura. Existe un área de investigación muy poco explorada sobre la utilización de disolventes tales como los freones para estudios de tautomería a muy baja temperatura.
- Muchos heterociclos tautomerizables son bastante insolubles en muchos disolventes, debido a la existencia de enlaces de hidrógeno fuertes en estado sólido. Incluso aquellos heterociclos que son algo solubles, suelen precipitar al enfriar. El DMSO, muy utilizado para disolver heterociclos, no se presta a estudios a baja temperatura por su relativamente alto punto de fusión (la acetona es un posible sustituto pero hay que tener en cuenta la posibilidad de una adición reversible del heterociclo a la acetona [11]).
- Los equilibrios tautómeros que implican rupturas de enlaces C–H tienen energías de activación en la escala de tiempos de la RMN lo que permite observar los dos tautómeros. Si la barrera es débil, caso de la tautomería anular del imidazol (sección III), sólo se verán señales promedio y habrá que recurrir al enfriamiento para determinar la constante de equilibrio K_T y las constantes de velocidad k_1/k_{-1} (Esquema 13).



Esquema 13. Aspectos cinéticos y termodinámicos de la tautomería.

¿Se pueden separar dos tautómeros?

El Esquema 14 es un resumen simplificado de las diferentes posibilidades en lo que concierne una eventual separación de las especies en equilibrio. Figuran unas estimaciones de la barrera (en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), de la velocidad (en s^{-1}) y del tiempo de vida media (en s), así como un ejemplo de cada caso, entre ellos dos de tautomería. En el caso de la acetilacetona, el equilibrio ceto/enol se encuentra en la zona donde la barrera es superior a 85 kJ mol^{-1} mientras que el equilibrio enol/enol es mucho más rápido (barrera del orden de $20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Separación de isómeros	Equilibrio en solución	Fenómeno	ΔG^\ddagger kJ·mol ⁻¹	k s ⁻¹	t s	Ejemplos
Se pueden separar	No	1. Isomería	> 170	< 10 ⁷	> 10 ⁷	Cis-trans
	Lento	2. Equilibrio	85-170	10-10 ⁻⁷	10 ⁻¹ -10 ⁷	Syn-anti
No se pueden separar	Rápido $\Delta G^\ddagger < 125$ kJ·mol ⁻¹	3. Señales finas en RMN a 500 K	>85	<10	>10 ⁻¹	Ceto-enol
		4. Coalescencia	40-105	10 ⁴ -10	10 ⁻¹ -10 ⁻⁴	Inversión del nitrógeno
		5. Señales finas promedio en RMN a 150 K	<40	>10 ⁴	<10 ⁻⁴	

Esquema 14. Clasificación de los diferentes procesos.

El uso de la HPLC dinámica

La posibilidad de separar por HPLC, en ciertas condiciones, los dos tautómeros de la acetilacetona (Figura 2) es poco conocida, siendo Moriyasu y colaboradores quienes lo consiguieron [12,13]. Naturalmente la separación es tanto mejor cuanto la temperatura es más baja [parte a), caso e]. También se observa que K_T depende mucho del disolvente (parte b). Obviamente, a la salida de la columna los dos tautómeros se equilibran inmediatamente.

Por RMN en estado sólido (SSNMR) ha sido posible estudiar el equilibrio autotrope enol-enol de la acetilacetona dentro de una cavidad y medida su barrera a la transferencia del protón, 51 kJ·mol⁻¹ [14].

¹ Elguero J, Marzin C, Katritzky AR, Linda P. The Tautomerism of Heterocycles, Academic Press, New York, 1976.

² Minkin VI, Gamovskii AD, Elguero J, Katritzky AR, Denisko OV. The tautomerism of heterocycles: Part 4. Five-membered rings with two or more heteroatoms. Adv. Heterocycl. Chem. 2000; 76: 157-323.

³ Elguero, J. Tautomerism in Brenner's Encyclopedia of Genetics, 2nd Edition, 2013.

⁴ Elguero, J. Tautomerism: A Historical Perspective in Tautomerism, Ed. L. Antonov, Wiley-VCH, Weinheim, 2016.

⁵ Hückel E. Quantentheoretische Beiträge zum Benzolproblem. I. Die Elektronenkonfiguration des Benzols und verwandter Beziehungen. Z. Phys. 1931; 70:204-286.

⁶ Minkin, V. I.; Glukhovtsev, M. N.; Simkin, B. Ya. Aromaticity and Antiaromaticity, John Wiley, New York, 1994.

⁷ Armit JW, Robinson R. Polynuclear Heterocyclic Aromatic Types. Part II. Some Anhydronium Bases J. Chem. Soc. 1925; 127:1604-1618.

⁸ Born, M.; Oppenheimer, R. Zur Quantentheorie der Molekeln. Ann. Phys. (Leipzig), 1927; 84:457-484.

⁹ Hammond GS. A correlation of reaction rates. J. Am. Chem. Soc. 1955; 77:334-338.

¹⁰ Referencia [1], p. 412.

¹¹ Roumestant ML, Viallefont P, Elguero J, Jacquier R. Recherches dans la serie des azoles. XLIII. Etude par RMN de la tautomerie des azoles. Tetrahedron Lett. 1969; 10:495-498.

¹² Moriyasu, M.; Kato, A.; Hashimoto, Y. HPLC separation of keto and enol tautomers of several ketones at low temperatures. Chem. Lett. 1984; 1181-1184.

¹³ Moriyasu, M.; Kato, A.; Hashimoto, Y. Kinetic studies of fast equilibrium by means of high-performance liquid chromatography. Part 11. Keto-enol tautomerism of some β -dicarbonyl compounds. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 1986, 515-520.

¹⁴ Claramunt RM, López C, Lott S, Santa María MD, Alkorta I, Elguero J. Solid-state NMR study of the tautomerism of acetylacetone included in a host matrix. Helv. Chim. Acta, 2005; 88:1931-1942.

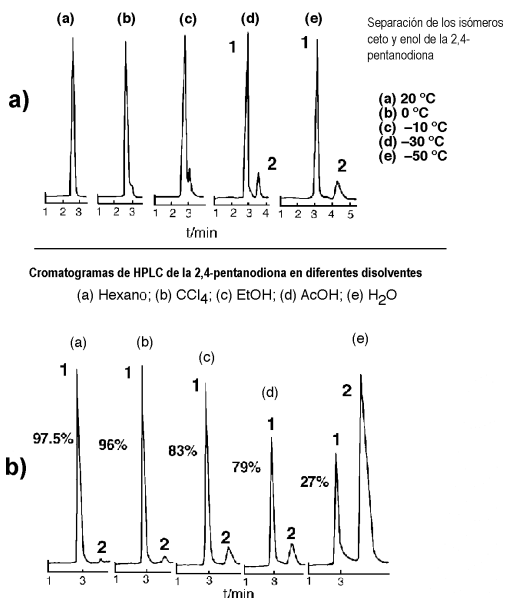
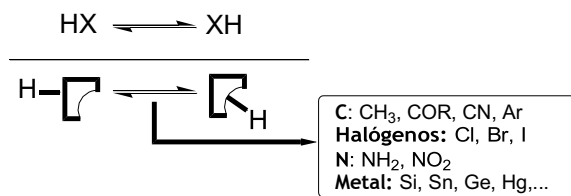


Figura 2. Separación por HPLC de los tautómeros ceto y enol de la acetilacetona a) a baja temperatura y b) en función del disolvente.

VI. Hay tautomerías no prototrópicas

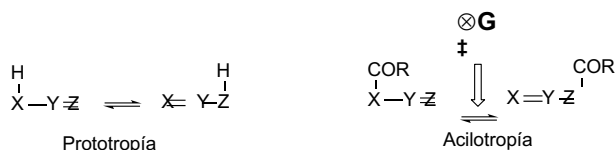
Hasta ahora nos hemos limitado a considerar tautomerías en las que la entidad que migra es el protón. Eso es normal, ya que las prototropías son de lejos las más comunes. Pero, en principio, otros grupos pueden migrar (Esquema 15): grupos carbonados (metilos, alquilos, acilos, ciano, arilos, ...), halógenos, grupos nitrogenados (aminas, nitro, ...), así como metales.



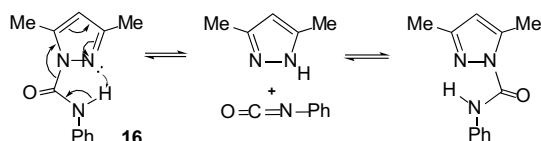
Esquema 15. Otros grupos que pueden migrar.

Vamos a ilustrar el Esquema 15 con algunos ejemplos.

Acilotropías



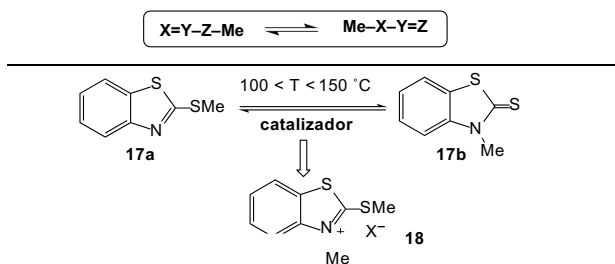
Un ejemplo Disolvente: α -cloronaftaleno, $T_C = 195^\circ\text{C}$, $\otimes G^\ddagger = 100 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$



Esquema 16. Migración intermolecular del grupo CONHC_6H_5 .

Es posible observar la coalescencia de las señales de los metilos del compuesto **16**: a 195°C en un disolvente aromático clorado de alto punto de ebullición, los dos metilos dan una señal de coalescencia a partir de la cual se calcula una barrera de $100 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Bien que el mecanismo implique la disociación en fenilisocianato y 3,5-dimetilpirazol, es decir, una eliminación/adición (Esquema 16), el balance es una acilotropía [15]. En efecto, al descender a temperatura ambiente, las señales de los metilos se vuelven diferentes (reversibilidad).

Metilotropías.



Esquema 17. Proceso general y migración de un CH_3 entre el azufre y el nitrógeno del benzotiazol.

Heterociclos en los cuales el metilo está unido a un heteroátomo (antes y después de la transferencia) pueden ser equilibrados. El proceso de transferencia del metilo necesita un catalizador, la sal cuaternaria común a los dos. Así, el 2-metiltiobenzotiazol **17a** se isomeriza en *N*-metilbenzotiazol-2-tione **17b** en presencia de la sal cuaternaria **18**. En principio, es posible efectuar la reacción inversa, pero en el ejemplo del Esquema 17, la forma **17b** es mucho más estable que la **17a**.

Aptitud migratoria de sustituyentes X unidos al nitrógeno

Se han resumido en el Esquema 18 las aptitudes migratorias de diferentes grupos. Los valores (en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) corresponden a derivados 1-sustituídos del pirazol.

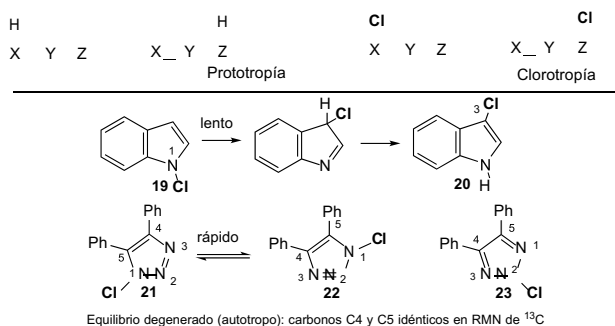
$\otimes G^\ddagger$ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	C_6H_5	CH_3	COR	SiR_3	GeR_3	H	HgR	SnR_3
	> 170	145	125	105	85	60-40	40	20

Esquema 18. Aptitud migratoria.

Debido a la alta energía necesaria para romper un enlace N–C, los alquilo y, aún más, los arilos, migran muy lentamente. Además se observa que la prototropía no es el proceso más rápido.

Clorotropías

Se sabe que el 1-cloroindol **19** se isomeriza en 3-cloroindol **20**, lo que corresponde formalmente a una clorotropía seguida de prototropía [16]. En la bibliografía se encuentra un ejemplo de clorotropía [17]: según los autores, el 1-cloro-4,5-difenil-1,2,3-triazol **21** estaría en equilibrio rápido y degenerado con una estructura idéntica **22** para poder explicar que sólo se observen señales promedio en RMN. Más tarde, se demostró que el producto tenía la estructura **23** [18].



Esquema 19. Ejemplos de clorotropías.

Metalotropías

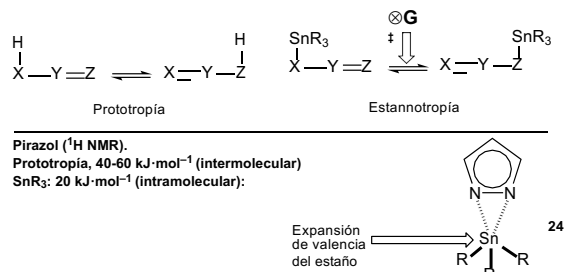
Los metales migran con menor o mayor facilidad (Esquema 18). Vamos a ilustrarlo con el caso del estaño (Esquema 20).

¹⁵ Referencia [2], página 194.

¹⁶ Ahn NT. Les règles de Woodward-Hoffmann, Ediscience, Paris, 1970, p. 51.

¹⁷ Gallagher TC, Sasse MJ, Storr RC. Fragmentation of N-chlorotriazoles. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1979; 419–420.

¹⁸ Cañada J, Claramunt RM, de Mendoza J, Elguero J. On the possibility of chlorotropy in aromatic azoles: the case of 1,2,3-triazoles and benzotriazoles. Heterocycles 1985; 23:2225–2228.

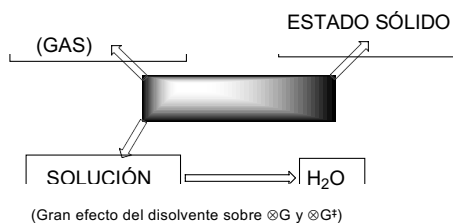


Esquema 20. Migración de un grupo SnR_3 en el pirazol.

En este caso, la migración es muy fácil ya que el proceso es intramolecular e implica una expansión de valencia (de 4 a 5) del átomo de estaño. Dado que el átomo de estaño es muy voluminoso, conviene visualizar el proceso como si fuese el pirazol el que se desplazase sobre la superficie del estaño. En cualquier caso, se trata de un fenómeno muy rápido que conduce a la observación de señales promedio finas en RMN de ^1H .

VII. Tautomería y estado físico

Cuando se efectúan estudios de tautomería, es muy importante tener en cuenta el estado físico de la muestra (Esquema 21).



Esquema 21. Los tres estados de la materia.

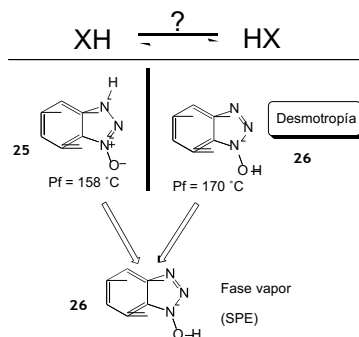
No hay muchos estudios de tautomería en solución acuosa, ya que cataliza los intercambios prototrópicos. Además, si se usa D_2O , tiene lugar el intercambio de los X-H por X-D (incluidos los C-H ácidos) con pérdida considerable de información. Examinemos los dos otros estados.

¿Hay prototropía en fase gas?

Como las prototropías son generalmente fenómenos intermoleculares (por ejemplo, la migración intramolecular-1,2 del protón en el pirazol es un proceso prohibido al que corresponde una barrera muy grande) para que la prototropía tenga lugar en fase vapor es necesario una colisión entre dos moléculas o una colisión con las paredes del aparato de

medida. Esto es una condición necesaria para determinar K_T por espectrometría de masas, ICR (resonancia de ión-ciclotrón) o SPE (espectroscopía de fotoelectrones). Es preciso recordar que en EM e ICR se trata de especies cargadas.

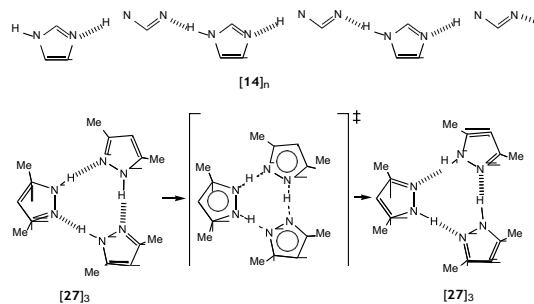
Las pruebas experimentales son dobles. La primera es que las proporciones de los dos tautómeros varían con la temperatura de manera reversible. La segunda es el experimento descrito en el Esquema 22 [19]: el N-óxido de benzotriazol cristaliza en uno u otro de los dos tautómeros **25** y **26** según las condiciones de cristalización (**desmotropía**). Que se parta de **25** o de **26**, el espectro SPE es idéntico al del tautómero más estable, el *N*-hidroxibenzotriazol **26**.



Esquema 22. Existencia de un equilibrio prototrópico en fase vapor.

¿Hay prototropía en el estado sólido?

La respuesta es sí, aunque raros son los compuestos que la presentan. Para que un sólido soporte una transferencia de protón sin destrucción de su estructura cristalina es necesario que el estado inicial y el estado final sean iguales (proceso "autotrope"). Además, es necesario un canal para el paso del protón, generalmente un enlace de hidrógeno. En fin, es necesario que el número de protones transferidos sea pequeño, 2 a 4. Esta última condición impide la prototropía en las cadenas "infinitas" (muy largas) formadas por las moléculas de imidazol [14]_n. Al contrario, ciertos pirazoles, como el 3,5-dimetilpirazol **27** presentan prototropía en el estado sólido [20] (Esquema 23). Algunos pocos sistemas más presentan prototropía en cristales [21].

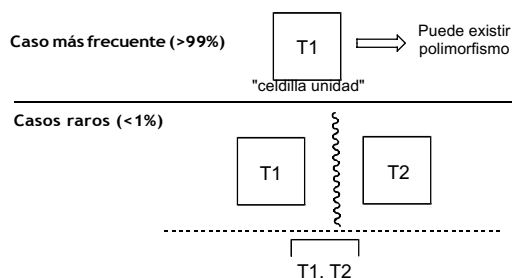


Esquema 23. Los casos del imidazol y del 3,5-dimetilpirazol.

Tautomería y rayos X

La relación entre tautomería y rayos X (o difracción de neutrones) merece ser clarificada. En el Esquema 24, T1 y T2 son dos tautómeros de un mismo compuesto, HX y XH. El caso más frecuente es aquel en el cual la celdilla cristalina contiene un único tautómero, por ejemplo T1. Es posible que T1 cristalice en diferentes grupos espaciales (generalmente con conformaciones diferentes) lo cual se conoce con el nombre de **polimorfismo**. En otros casos, el compuesto cristaliza, en función del disolvente, sólo o con moléculas de disolvente; en el último caso se habla de **pseudopolimorfismo**.

Hay otras dos posibilidades, ambas raras pero conocidas en el caso heterociclos aromáticos: 1) El fenómeno conocido con el nombre de **desmotropía** [^{22,23,24,25,26}] en el cual un compuesto cristaliza bajo formas tautómeras diferentes, algunas veces separadas (diferentes disolventes), otras en el mismo ensayo de cristalización. En este último caso, hay que separarlos manualmente, bajo el microscopio. 2) A veces, en la celdilla unidad se encuentran dos tautómeros, unidos por enlaces de hidrógeno, por ejemplo **28a** y **28b** (Esquema 26).



Esquema 24. Cómo cristalizan los compuestos tautómeros.

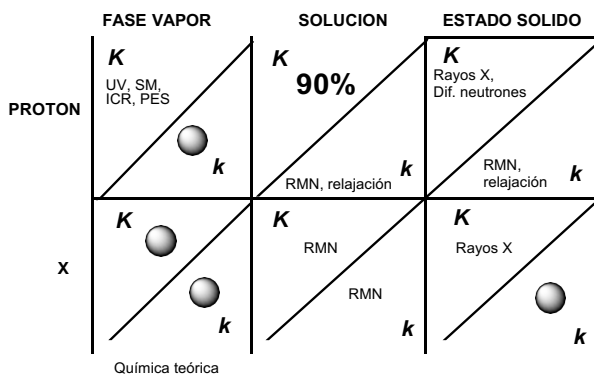
VIII. El universo tridimensional de la tautomería

Los estudios sobre tautomería se pueden clasificar teniendo en cuenta tres ejes (Esquema 25): según que el grupo que migra sea el protón u otra entidad X (arriba/abajo), según que el fenómeno estudiado concierna la parte termodinámica (K) o la parte cinética (k) (diagonal), o, finalmente, según que el medio del estudio sea la fase vapor, la solución o el estado sólido (izquierda/derecha). En los 12 dominios (2 x 2 x 3) del Esquema 25, un círculo gris corresponde a dominios donde escasean los datos experimentales.

Protón frente a X. Parte equilibrio (K): En general, mismo tautómero (salvo enlaces de hidrógeno y efectos estéricos).

Protón frente a X. Parte cinética (k): la velocidad de migración es muy dependiente de X: Sn > Hg > H > Ge > Si > COR > Me > Ph (Esquema 18).

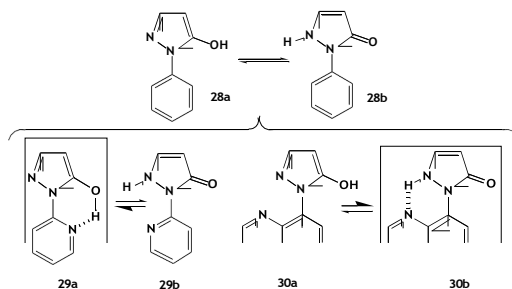
Vapor/Solución/Sólido. Se observan grandes diferencias tanto en lo que concierne el equilibrio (K) como la cinética (k). La fase vapor se parece a una solución en un disolvente apolar-aprótico (por ejemplo, hexano) a alta dilución. En general, el tautómero más abundante en solución es aquel que se encuentra en el cristal (donde los enlaces de hidrógeno intermoleculares juegan un papel esencial).



Esquema 25. Las 12 regiones de la tautomería.

Efecto de los enlaces de hidrógeno sobre la posición del equilibrio

Consideremos el caso de la tautomería de las pirazol-5-onas, por ejemplo, la 1-fenil **28** (Esquema 26). Los dos tautómeros **28a** y **28b** tienen estabilidades comparables.



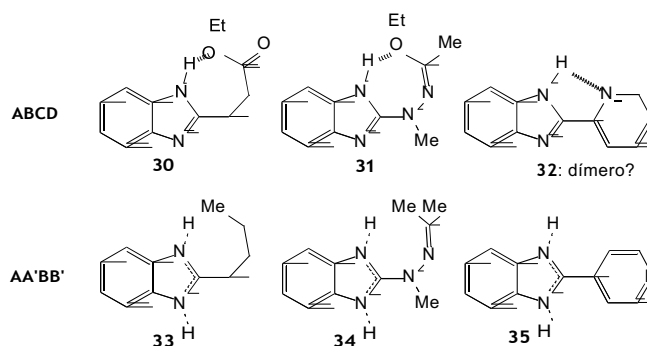
Esquema 26. Un enlace de hidrógeno intramolecular puede desplazar el equilibrio en ciertas pirazolinonas.

Un enlace de hidrógeno intramolecular desplaza el equilibrio hacia la izquierda (**29a**) o hacia la derecha (**30b**) según el tautómero implicado.

Efecto de los enlaces de hidrógeno sobre la constante de velocidad k

Un enlace de hidrógeno intramolecular también ejerce una influencia sobre la velocidad de transferencia del protón. Cuando la migración del protón implica la ruptura de un fuerte enlace

X...H intramolecular, el fenómeno se vuelve más lento. Es el caso de los bencimidazoles del Esquema 27: en RMN de ^1H , (100 MHz, 28 °C, CDCl_3), los 4 protones del anillo benzénico aparecen como un sistema ABCD en el caso de los compuestos **30-32** y como un sistema AA'BB' en el caso de los compuestos **33-35** [27,28].



Esquema 27. Influencia de un enlace de hidrógeno intramolecular sobre la velocidad de migración del protón en ciertos bencimidazoles.

Tautomería y química teórica

En lo que concierne las relaciones entre la química teórica y la tautomería, el Esquema 28 resume la situación actual. Señalemos que de una manera general y salvo para estructuras muy grandes (productos naturales, biomoléculas), los métodos semi-empíricos o de mecánica molecular no deben ser utilizados.

¹⁹ Pfister-Guillouze G, Gracián F, Paéz JA, García Gómez C, Elguero J. Study of 1-hydroxybenzotriazole/ benzotriazole N-oxide in the gas phase by photoelectron spectroscopy. *Spectrochim. Acta* 1995; A51:1801–1807.

²⁰ Klein O, Aguilar-Parrilla F, López J.M, Jagerovic N, Elguero J, Limbach HH. A dynamic NMR study of the mechanisms of double, triple and quadruple proton and deuterium transfer in cyclic hydrogen bonded solids of pyrazole derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 11718–11732 y referencias citadas.

²¹ López Del Amo JM, Langer U, Torres V, Buntkowsky G, Vieth HM, Pérez-Torralba M, Sanz D, Claramunt RM, Elguero J, Limbach HH. NMR studies of ultrafast intramolecular proton tautomerism in crystalline and amorphous N,N'-diphenyl-6-aminofulvene-1-aldimine: solid-state, kinetic isotope, and tunneling effects. *J. Am. Chem. Soc.* 2008; 130:8620–8632.

²² Foces-Foces C, Llamas-Saiz AL, Claramunt RM, López C, Elguero J. Structure of 3(5)-methyl-4- nitro pyrazole in the solid state: tautomerism, crystallography and the problem of desmotropy. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994; 1143–1145.

²³ García MA, López C, Claramunt RM, Kenz A, Pierrot M, Elguero J. Polymorphism vs. desmotropy: the cases of 3-phenyl- and 5-phenyl-1H-pyrazoles and 3-phenyl-1H-indazole. *Helv. Chim. Acta* 2002; 85:2763–2776.

²⁴ Reviriego F, Alkorta I, Elguero J. Desmotropy in reduced plumbagins: α - and β -dihydroplumbagins. *J. Mol. Struct.* 2008; 891:325–328.

²⁵ Holzer W, Claramunt RM, López C, Alkorta I, Elguero J. A study in desmotropy. *Solid State NMR*, 2008; 34:68–76.

²⁶ Elguero J. Polymorphism and desmotropy in heterocyclic crystal structures. *Cryst. Growth. Des.* 2011; 11:4731–4738.

²⁷ Elguero J, Llouquet G, Marzin C. *Tetrahedron Lett.* 1975; 16:4085–4086.

²⁸ Marzin C, Peek M, Elguero J, Figeys HP, Defay N. *Heterocycles* 1977; 6:911–927.

GAS	SOLUCIÓN
K Cálculos: muy bien Experimental: impreciso	K Cálculos: regular (caso de H ₂ O, CCl ₄ ,...) Experimental: muy bien
k Cálculos: difíciles Experimental: casi nada	k Cálculos: difíciles Experimental: bien (DMSO, HMPT,...)

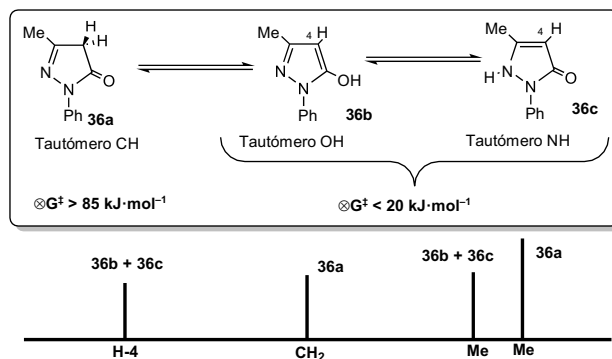
Esquema 28. Teoría y experimento.

Las cuatro posibilidades del Esquema 28 muestran la contradicción entre el teórico que prefiere una molécula aislada y el experimentador que obtiene la mayoría de sus datos de fases condensadas (solución, estado sólido). Los caminos de reacción, salvo los intramoleculares, son difíciles de calcular. De la misma manera, los efectos de disolvente (generales y específicos), bien que abordables, plantean serios problemas a nivel de cálculo.

IX. ¿Como determinar K_T ?

Si nos limitamos a la RMN de protón (para una revisión, ver [29]), que representa la gran mayoría de las publicaciones de determinación de K_T , encontramos dos situaciones que hemos ilustrado en el Esquema 29 con el caso de la 1-fenil-3-metilpirazol-5-ona **36**.

La proporción de tautómero CH, **36a**, que está separado de los dos otros por una gran barrera de activación, se determina por integración, ya sea del CH₂ o del metilo. La proporción relativa de los tautómeros OH, **36b**, y NH, **36c**, se determina por interpolación ya que la barrera que los separa es baja lo que conduce a la observación de señales promedio. Para ello hay que conocer los desplazamientos químicos de productos modelo, generalmente O-Me y N-Me, que, en general, constituye una fuente de posibles errores.



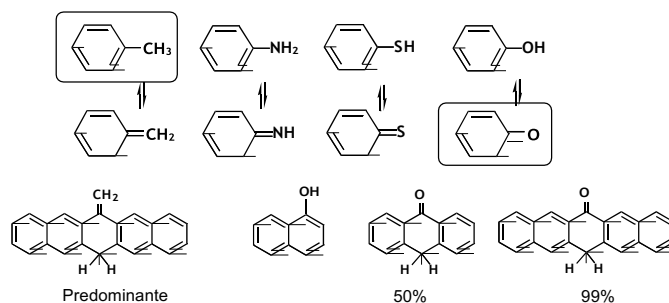
Esquema 29. Determinación de la tautomería de las pirazolinonas por RMN de protón.

²⁹ Claramunt RM, López C, Santa María MD, Sanz D, Elguero J. The use of NMR Spectroscopy to Study Tautomerism. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2006; 49:169–206.

En este campo el progresivo avance hacia espectrómetros de altos campos (hoy los de 500 MHz son rutina) y la mayor pureza de los disolventes de RMN, sobre todo ausencia de agua y de trazas de HCl) han hecho que la tautomería se haya vuelto más lenta y donde antes se observaban señales promedio hoy se ven señales separadas.

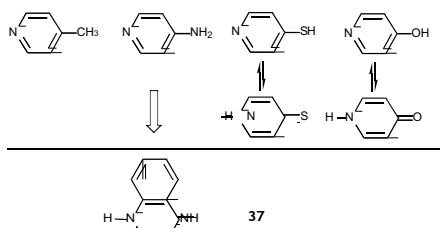
X. Tautomería y aromaticidad

Bien que esta puesta a punto esté dedicada a la tautomería de los compuestos heterocíclicos, es bueno recordar que tautomería y aromaticidad son dos conceptos íntimamente relacionados. En el Esquema 30 se ha representado la secuencia tolueno, anilina, tiofenol y fenol. Al cambiar CH₃ por NH₂, SH y OH, la proporción de tautómero no aromático aumenta [Error: Reference source not found]. Por otro lado, la adición de anillos bencénicos disminuye la aromaticidad del anillo central, como se ve en los ejemplos representados en el Esquema 30.



Esquema 30. Tautomería de compuestos aromáticos; los muy predominantes, encuadrados.

El Esquema 31 ilustra la aplicación de estas ideas a los heterociclos. En el caso de las piridinas sustituidas en posición 4, las 4-metil y 4-amino piridinas existen en su forma aromática mientras que la 4-mercapto y, sobre todo, la 4-hidroxi existen parcialmente en sus formas tiona y oxo. La adición de anillos bencénicos desplaza el equilibrio hacia las formas imino, tiona y oxo, tal es el caso de la 9-aminoacridina **37**.



Esquema 31. Tautomería de las piridinas sustituidas en posición 4.

Conclusiones.

1.- Si el químico se encuentra involuntariamente con un problema de tautomería.

Si el resultado obtenido se enmarca dentro del modelo que hemos presentado en esta revisión, no es necesario que se detenga a demostrar lo que ya es conocido. Si por el contrario, el resultado está en contradicción con los conceptos básicos aquí enunciados, entonces serán necesarias pruebas muy sólidas, cuya interpretación dará lugar a una publicación importante.

2.- Si el químico se propone estudiar un problema de tautomería.

Por analogía con la teoría de la información de Shannon, el valor de un resultado depende de la relación entre lo que es nuevo y lo que era ya conocido. El Esquema 25 indica las zonas en las cuales la información es escasa o nula y donde queda mucho trabajo que hacer.

Hoy día, una contribución importante a la tautomería de los heterociclos necesita satisfacer a una o varias de las siguientes condiciones: a) una molécula muy original; b) un nuevo método de estudio (por ejemplo, microscopía crioelectrónica); c) una fase rara (cristales líquidos como disolventes; migración de un metilo en fase sólida, migración de metales – fluxionalidad– en cristales,...). Todo ello, en lo que se refiere al estado fundamental, ya que el estudio de tautomería en los estados excitados sigue aún muy poco estudiada.

AGRADECIMIENTO

A Jonathan Nué por su ayuda en este trabajo y al C.S.I.C. por mantenerme como *Profesor ad honorem*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Elguero J, Marzin C, Katritzky AR, Linda P. The Tautomerism of Heterocycles. New York: Academic Press; 1976.
2. Minkin VI, Garnovskii AD, Elguero J, Katritzky AR, Denisko OV. The tautomerism of heterocycles: Part 4. Five-membered rings with two or more heteroatoms. *Adv Heterocycl Chem.* 2000; 76: 157– 323.
3. Elguero J. Tautomerism. In: Maloy S, Hughes K, editors. *Brenner's Encyclopedia of Genetics* 2nd edition, Vol 1. San Diego: Academic Press; 2013. p. 18–22.
4. Elguero J. Tautomerism: A Historical Perspective in Tautomerism. En Antonov L. Ed. *Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*; 2016. p. 1-10.
5. Hückel E. Quantentheoretische Beiträge zum Benzolproblem. I. Die Elektronenkonfiguration des Benzols und verwandter Beziehungen. *Z Phys.* 1931; 70: 204–286.
6. Minkin VI, Glukhovtsev MN, Simkin B-Ya. *Aromaticity and Antiaromaticity*. New York: John Wiley; 1994.
7. Armit JW, Robinson R. Polynuclear Heterocyclic Aromatic Types. Part II. Some Anhydronium Bases. *J Chem Soc.* 1925; 127: 1604–1618.

8. Born M, Oppenheimer R. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Ann Phys (Leipzig)*. 1927; 84: 457–484.
9. Hammond GS. A correlation of reaction rates. *J Am Chem Soc*. 1955; 77:334–338.
10. Elguero J, Marzin C, Katritzky AR, Linda P. *The Tautomerism of Heterocycles*. New York: Academic Press; 1976. p. 412.
11. Roumestant ML, Viallefont P, Elguero J, Jacquier R. Recherches dans la serie des azoles. XLIII. Etude par RMN de la tautomerie des azoles. *Tetrahedron Lett*. 1969; 10: 495–498.
12. Moriyasu M, Kato A, Hashimoto Y. HPLC separation of keto and enol tautomers of several ketones at low temperatures. *Chem Lett*. 1984; 1181–1184.
13. Moriyasu M, Kato A, Hashimoto Y. Kinetic studies of fast equilibrium by means of high-performance liquid chromatography. Part 11. Keto–enol tautomerism of some β -dicarbonyl compounds. *J Chem Soc Perkin Trans 2*. 1986; 4: 515–520.
14. Claramunt RM, López C, Lott S, Santa María MD, Alkorta I, Elguero J. Solid-state NMR study of the tautomerism of acetylacetone included in a host matrix. *Helv Chim Acta*. 2005; 88: 1931–1942.
15. Minkin VI, Garnovskii AD, Elguero J, Katritzky AR, Denisko OV. The tautomerism of heterocycles: Part 4. Five-membered rings with two or more heteroatoms. *Adv Heterocycl Chem*. 2000; 76: 157–323
16. Ahn NT. *Les règles de Woodward-Hoffmann*. Paris: Ediscience; 1970. p. 51.
17. Gallagher TC, Sasse MJ, Storr RC. Fragmentation of N-chlorotriazoles. *J Chem. Soc Chem Commun*. 1979; 9: 419–420.
18. Cañada J, Claramunt RM, de Mendoza J, Elguero J. On the possibility of chlorotropy in aromatic azoles: the case of 1,2,3-triazoles and benzotriazoles. *Heterocycles*. 1985; 23: 2225–2228.
19. Pfister-Guillouzo G, Gracián F, Paéz JA, García Gómez C, Elguero J. Study of 1-hydroxy-benzotriazole/benzotriazole N-oxide in the gas phase by photoelectron spectroscopy. *Spectrochim Acta*. 1995; A51:180.
20. Klein O, Aguilar-Parrilla F, López JM, Jagerovic N, Elguero J, Limbach HH. A dynamic NMR study of the mechanisms of double, triple and quadruple proton and deuteron transfer in cyclic hydrogen bonded solids of pyrazole derivatives. *J Am Chem Soc*. 2004; 126: 11718–11732.
21. López Del Amo JM, Langer U, Torres V, Buntkowsky G, Vieth HM, Pérez-Torralba M, et al. NMR studies of ultrafast intramolecular proton tautomerism in crystalline and amorphous N,N'-diphenyl-6-aminofulvene-1-alimine: solid-state, kinetic isotope, and tunneling effects. *J Am Chem Soc*. 2008; 130: 8620–8632.
22. Foces-Foces C, Llamas-Saiz AL, Claramunt RM, López C, Elguero J. Structure of 3(5)-methyl-4- nitropyrazole in the solid state: tautomerism, crystallography and the problem of desmotropy. *J Chem Soc Chem Commun*. 1994; 9: 1143–1145.
23. García MA, López C, Claramunt RM, Kenz A, Pierrot M, Elguero J. Polymorphism vs. desmotropy: the cases of 3-phenyl- and 5-phenyl-1H-pyrazoles and 3-phenyl-1H-indazole. *Helv Chim Acta*. 2002; 85: 2763–2776.
24. Reviriego F, Alkorta I, Elguero J. Desmotropy in reduced plumbagins: α - and β -dihydroplumbagins. *J Mol Struct*. 2008; 891: 325–328.

25. Holzer W, Claramunt RM, López C, Alkorta I, Elguero J. A study in desmotropy. *Solid State NMR*. 2008; 34: 68–76.
26. Elguero J. Polymorphism and desmotropy in heterocyclic crystal structures. *Cryst Growth Des*. 2011; 11: 4731–4738.
27. Elguero J, Llouquet G, Marzin C. *Tetrahedron Lett*. 1975; 16: 4085–4086.
28. Marzin C, Peek M, Elguero J, Figeys HP, Defay N. *Heterocycles*. 1977; 6: 911–927.
29. Claramunt RM, López C, Santa María MD, Sanz D, Elguero J. The use of NMR Spectroscopy to Study Tautomerism. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2006; 49:169–206.

ÍNDICE DE MATERIAS
Rev. Soc. Quím. Perú
Vol. 86 – Año 2020

- Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de las partes aéreas de *Solanum radicans* L.F. “huallpachaqui”, por Jorge A. García, Doris L. Laos, Nelly V. Vega, María D.R. Bendezú, Paulina E. Yarasca, Juan J. Guillermo, Felipe Surco-Laos. 5
- Actividad antioxidante y antimicrobiana del hidrolizado de gelatina de pieles de *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito”, por Tejada Periche Eder Eduardo, Fernández Jerí Yadira, Salazar Salvatierra María Elena. 207
- Actividad antioxidante, polifenoles y flavonoides de *Coffea arabica* de cinco regiones peruanas, por Silvia Suárez Cunza, Elvi Alfaro Pillihuaman, Emilio Germán Ramírez Roca
- Actividad inhibitoria in vitro de los extractos acuosos de los frutos de *Hylocereus megalanthus* y *Passiflora tripartita* var. *mollissima* sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, por Erick Raúl Coral Caycho, María Rosario Calixto Cotos, María Mercedes Soberón Lozano. 93
- Análisis bioquímico de dos fracciones con acción anticoagulante de las hojas de *Oenothera rosea* “chupasangre”, por Mirtha Yarlequé, Miguel Zaldívar, Pablo Bonilla, Armando Yarlequé. 219
- Aplicación de las antocianinas obtenidas a partir de *Zea mays* L. (maíz morado) como agentes inhibidores de la agregación de los péptidos amiloide y tipo amiloide (tripsina agregada), por César A. Zaa, Fernando Retuerto Prieto, Álvaro J. Marcelo.
- Biosorción del colorante azul de metileno usando los cladodios de la tuna (*Opuntia ficus indica*), por Carmencita Lavado Meza, Rosario Sun Kou, Tracy Castro Arroyo. 231
- Búsqueda de biomarcadores para la discriminación de las variedades de kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) “chilliwa” y “ramis” por medio de metabolómica non-targeted, por Carlos Ríos, Fabio Espichán, Candy Ruiz, Rosario Rojas. 13
- Capacidad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas de *Senecio rufescens* DC, por Enrique Javier Aguilar Felices, Pablo Enrique Bonilla Rivera, Edwin Carlos Enciso Roca.
- Caracterización físico química de los componentes volátiles del *Tecoma fulva* subsp. *arequipensis* (cahuato), por Jorge Chávez Fernández, Virginia Lizárraga Lazo, Eleana Vargas de Nieto. 246

- Contribución al estudio fitoquímico de los tubérculos de *Ullucus tuberosus* caldas, por Ingrit Elida Collantes Díaz, Elena Alicia Cóndor Cuyubamba. 105
- Contribución al estudio fitoquímico del zumo de *Colignonia parviflora* subsp. *Biumbellata* (saqta), por Juan Carlos Chipayo Auccapuma, Jessica Ivana Nieto Juárez, Ingrit Elida Collantes Díaz. 112
- Determinación de la concentración de quitosano en polvo por viscosimetría capilar, por Agustín A. Rodríguez Llegado, Jesús A. Cjuno H. 24
- Determinación de morina en té verde y café por voltamperometría de adsorción utilizando electrodos de carbono modificados con poli (3,4-etilendioxitiofeno) y líquido iónico, por Daniel Peña, Elkin Pulido, Manuel Otiniano, Edgar Nagles. 34
- Determinación de polifenoles totales y actividad antioxidante de extracto de semillas de uvas residuos de la producción de piscos, por Felipe Surco-Laos, Hilda Ayquipa Páucar, Wilfredo Quispe Gamboa, Jorge García Ceccarelli, Manuel Valle Campos. 123
- Distribución de arsénico en agua superficial y sedimento en la cuenca del río Carrizal, Manabí-Ecuador, por Ana María Aveiga Ortiz, Patricio Javier Noles Aguilar, Fabián Peñarrieta Macías, Erika Murgueitio Herrera. 260
- Efecto de las semillas de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) en las condiciones para la clarificación del agua del río Sama de Tacna, por Marcial Alfredo Castillo Cohaila, Edgardo Óscar Avendaño Cáceres. 47
- Estudio de la coagulación de partículas coloidales de AgI por influencia de quitosano con sulfato de aluminio, por Miguel Allcca Chullca, Nelson Tapia Huananbal, Claudia Villanueva Huerta, Enrique Guzmán Lezama, Patricio Muñoz Huillcas, Neptalí Ale Borja, Holger Maldonado García. 132
- Estudio químico del aceite esencial de la “yareta” *Smalanthus parviceps* (Blake) Rob., por Gianella Neves Ordóñez, Marisol Fernández Ruiz, Sugía Solís Miranda, Nino Castro Mandujano, Carlos Serrano Flores. 143
- Evaluación de la estabilidad de un digestor anaerobio termófilo, por Edson Morales Ch. 152
- Evaluación del nivel contaminante de Ocratoxina A (Ota) mediante columnas de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta eficiencia en *Coffea arabica* L. “café”, por Félix Hugo Milla Flores, Américo Castro Luna. 164

- Evaluación del recubrimiento de la ignimbrita empleando gel de polisiloxano funcionalizado con nanopartículas de plata, por Rosa Aída Balvin Beltrán, Julia Liliana Zea Álvarez, Corina Vera Gonzales, Luis De Los Santos Valladares, María Elena Talavera Núñez. 175
- Extracción y caracterización del alginato de sodio de la macroalga *Macrocystis pyrifera*, por Yerald Oré B., E. Renzo Pichilingue L., Ana C. Valderrama N. 276
- Gestión ambiental en la enseñanza de la química analítica, por Elizabeth Norma Espinosa Descalzo. 288
- Optimización de la producción de fructooligosacáridos a partir del extracto de algarrobo utilizando fructosiltransferasas, por Carmen Peña Suasnabar, Amparo Iris Zavaleta. 192
- Optimización de la remoción de compuestos orgánicos persistentes mediante el proceso foto-fenton, por César Gutiérrez, Alex Pilco. 58
- Remoción de mercurio empleando carbón activado preparado a partir de aguaje (*Mauritia flexuosa*), por Daniel Obregón-Valencia, Ilse Acosta, Isabel Díaz, Rosario Sun Kou. 70
- Reúso en procesos de blanqueo textil de los efluentes provenientes de tinturas con colorantes reactivos negros de colorados mediante el método de Fenton, por Carmen L. Uribe Valenzuela, Melissa J. Caballero Bustos, Percy O. Cárdenas Torres, Emilia G. Hermoza Guerra. 300
- Síntesis, caracterización y evaluación de la actividad biológica de compuestos de coordinación de cobalto con pirazidamina, por Natalia Karolina Chávez Llallire, Rocío Isabel Ramírez Panti, Patricia Sheen Cortovarria, Mirko Juan Zimic Peralta, Ana Cecilia Valderrama Negrón. 315
- Síntesis y caracterización de nanoestructuras tipo cobre-selenio obtenidas mediante las técnicas de microondas y mecanosíntesis, por Aldo Javier Guzmán Duxtán, Elvis Mauricio Jiménez Peña.
- Síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre (NPsCu) por el método Poliol asistido vía microondas (MW), por Aldo Javier Guzmán Duxtán, Joel Claudio Rengifo Maravia, Jezabel Milagros Echevarría Muñoz.
- Tratamiento fisicoquímico de los efluentes del proceso de lavado de lana en una industria textil de Arequipa, por María Ofelia Guillén Zevallos, Virginia Pérez Murillo, Tania Quispe Carrizales, María Elena Talavera Núñez, Flora Elsa Huamán Paredes.

- Uso de cloro electrogenerado a partir de NaCl en medio ácido como una propuesta para la lixiviación de oro aluvial, por Ulises Quiroz Aguinaga, Angélica María Baena Moncada, Adolfo La Rosa-Toro Gómez.
- Variación estacional de la composición química del aceite esencial de las hojas de *Ophryosporus peruvianus*, por Edith María Fernanda Mattos Vila, Ingrid Elida Collantes Díaz. 329

Artículo de enseñanza de la química

- Una aproximación a la tautomería de los heterociclos aromáticos, por José Elguero

ÍNDICE DE AUTORES

Rev. Soc. Quím. Perú

Vol. 86 – Año 2020

Aguilar O., José L.	De La Cruz R., Pedro
Alarcón R., Rafael	327	Delgadillo, Julio	141
Alata M., Evelin	231	Erazo E., Raymundo	163
Alegría A., María C.	Flores R., Eduardo	175
Alejandro P., Gabriel	163	Flores, Lisveth	351
Almandoz L., Andrea L.	Franco P., Freddis	293
Alvarado L., George	189	Fuentes C., María E.	258
Anaya F., Oscar G.	153	García C., Jorge	109
Arenas Ch., Carlos	14	García, Williams	242
Arnao S., Inés	206	Giraldo B., Mariel	175
Baldeón, Iván	69	Gómez, Susana	258
Bautista, Lorgio	Gómez, Yelena	338
Berastain, Arturo	3	Gonzales H., Teresa J.	361
Cabrejos H., Gerson M.	Guerrero V., Tania E.	153
Cabrel R., Sthefanie	Guevara V., Manuel E.
Cabrera, Yon C.	361	Hurtado, Jasmín	3
Calle M., José L.	25	Ingaroca, Sharon	268
Castillo G., Yasmín	Jáuregui R., Segundo
Castro L., Américo	34	Jibaja, Sandro	3
Castro O., Jerson	361	Jorge M., Paola A.	25, 351
Castro, Américo	268	Jumbo S., Jennifer	293
Castro, Ángel G.	43	Juscamaita M., Juan
Ccaccya C., Ana M.	206	Kong, Maynard J.	43
Ceroni G., Mario	Laos A., Doris	109
Césare C., Mary F.	25,	Lazo, Fanny	141,
Chasquibol S., Nancy	327	Lezama, Helmer	242
Chávez S., Nadia	34	Loyola G., Eddie	109
Chirre F., Jaqueline	163	Manrique F., Joaquín J.
Chuquimboques M., Jerson	85	Martínez, Patricia	338
Cjuro F., Ivette	129	Medina L., Esperanza	189
Contreras L., Eliana	258	Medina, Esperanza	231
Cornejo S., Óscar	Medina, Juan C.	3
Crispín S., Fredy	315	Mendoza B., Jorge	85
Cuadros H., Yuri	231	Miranda Z., Luis	231
Cuzcano R., Ángel D.	Muedas T., Golfer

Muñoz H., Jessica	58	Sotelo M., Alejandrina H.
Muñoz J., Ana M.	258	Sotelo M., Alejandrina	34
Naveda R., Ricardo A.	351	Suárez R., Diego	216
Neira, Enrique	Sumarriva B., Liliana	34, 361
Nieto J., Jessica I.	Sun K, Rosario	69,
Orcon B., Beatriz	175		
Ortiz D., Luis F.	25	Suppé T., Nicole A.	305
Osorio A., Ana M.	14,	Surco L., Felipe	109
Oyola, Vanessa	3	Talavera N., María E.	14
Pacheco S., David	14	Talledo C., Arturo F.
		Tejada F., Gustavo	129
Pardo Figueroa D., Alexia	129		
Peña, Fiorela	338	Tellez M., Lena A.	25
Pérez Camino, María	327	Torrejón, Daniel
		Trujillo A., Enmer
Picasso, Gino	69,	Tunqui Q., Clesez	129
Porturas O., Raúl	315	Untiveros B., Graciela	3,
Pumachagua, Rodolfo	242	Valdivia R., José N.
Quispe, Edwin	Valencia A., Christian E.
Ramos H., Américo S.	97	Valle C., Manuel	109
Ramos, Daniel	3	Vargas M., Juan J.	305
Ramos, Norma	268	Vargas, Guino	338
Rebaza C., Teresa D.	Vásquez Q., Wilfredo	315
Redrovan P., Felipe F.	293	Velezmoro, Carmen	338
Reyes L., Walter A.	Vera G., Corina	14
Rodríguez B., Carmen A.	Vera I., Thalía G.	293
Rodríguez, Edith	141, ...	Vera V., Gabriela V.	305
Rodríguez, Pieer	Vergara R., Jorge	85
Rojas, Tatiana	258	Villegas S., Elvito F.	216,
Romero B., Hugo I.	293	Visitación F., Lizardo	25, 351,
Roncal, Elisa	3
Salas V., Walter F.	Vivas R., Dan	141,
		Yarasca C., Eliades	109
Sánchez, E.F.	141	Yarlequé, Armando	141,
Sandoval, Gustavo	Ynca B., Anthony	175
Santillán E., Fátima A.	Zea A., Julia L.	14
Sheen, Patricia	3		
Soberón L., Mercedes	206		



XXX CONGRESO PERUANO DE QUÍMICA
“Dra. Olga Lock Sing de Ugaz”
I CONGRESO IBERO LATINOAMERICANO DE NANOTECNOLOGÍA,
NANOCIENCIAS Y APLICACIONES
“Dra. Catalina Ruiz Pérez”
Del 18 al 20 de octubre 2021