

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

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 87 N° 2
ABRIL - JULIO - 2021



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

Areche Medina, Carlos
Universidad de Chile - Chile

Rueda Sánchez, Juan Carlos
Pontificia Universidad Católica del Perú

Cedrón, Juan Carlos
Universidad De la Laguna - España

Ruiz Quiroz, Julio
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Collantes Díaz, Ingrid
Universidad Nacional de Ingeniería

Santiago Contreras, Julio
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Gamboa Fuentes, Nadia
Pontificia Universidad Católica del Perú

Sun Kou, María del Rosario
Pontificia Universidad Católica del Perú

Quintana Cáceda, María
Universidad Nacional de Ingeniería

Valderrama Negrón, Ana Cecilia
Universidad Nacional de Ingeniería

Rodríguez Best, Angélica
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Vega Chacón, Jaime
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 87

ABRIL - JULIO 2021

N° 2

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

Comisión de Economía y Finanzas

Presidenta: Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo

Comisión de Publicaciones

Presidenta: Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón

Comisión de Actuaciones Científicas

Presidenta: MSc. Luz Castañeda Pérez

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

CONTENIDO
(Vol. 87 – N° 1 – 2021)

Editorial	95
Trabajos Originales	
- Aislamiento y elucidación estructural de un nuevo dépsido del liquen <i>Everniopsis trulla</i> , por Olivio Nino Castro Mandujano, Jesús López Rodilla, Sofia Pombal, Francisca Sanz González, Julio Santiago Contreras.	97
- Determinación de la actividad antioxidante de extractos de hojas de <i>Buddleja inkana</i> , <i>Oreocallis grandiflora</i> y <i>Chuquiraga spinosa</i> , por Karen Tufinio Miranda, Harold Ames Canchaya, Abel Vergara Sotomayor, Alejandro Fukusaki Yoshizawa, Karin Páucar Cuba.	107
- Estudio de la variación de la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de <i>Nasa ranunculifolia</i> (Kunth), por Arnold Jesús Pantoja Sánchez, Otilia Acha de la Cruz†, Ingrit Elida Collantes Díaz.	120
- Producción de celulosa por bacterias aisladas de caña de azúcar, por Jonathan Tuya Salas, Susana Gutiérrez Moreno, Fernando Merino Rafael.	128
- Niveles de As, Cd, Cu, Mn, Se y Zn en tejido muscular y hepático del <i>Cheilodactylus variegatus</i> Valenciennes, 1833 “pintadilla”, en la zona costera de Lima, Perú, por Sigfredo Alexander Quintana Paetán.	137
- Síntesis y caracterización de grafeno multicapa magnetizado, por Mercedes Puca Pacheco, María Guadalupe Neira Velázquez.	149
- Síntesis y caracterización de nuevos copolímeros de injerto termosensibles a partir de n-isopropilacrilamida y macromonómeros de 2-metil-2-oxazolina, por Ana María Paola Palacios, Juan Carlos Rueda.	163
- Validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate por, Jhonnell Samaniego, Jenny Huerta, Miguel Inocente, Juan Obregón, Maricela López.	180

Revista Arbitrada

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

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

If the authors reside abroad US \$ 110,00

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

Formato para los artículos

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

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

Editorial

Polimeros termocommutables

En años recientes, una de las áreas de los polímeros más ampliamente investigadas, por las importantes aplicaciones tecnológicas a que pueden dar lugar, es la síntesis de macromoléculas conmutables o sensibles a cambios en el medio ambiente tales como; por ejemplo, temperatura, pH, luz, y campo eléctrico o magnético. Este tipo de polímeros, conmutables o sensibles, tienen alto potencial para aplicaciones en biomateriales, en microsistemas, sensores y catálisis, entre otros. Entre los polímeros conmutables que más se han investigado se encuentran los polímeros termosensibles.

Se pueden obtener polímeros con respuesta térmica usando los homopolímeros y copolímeros de N-isopropilacrilamida, N-vinilcaprolactama, y vinilmetiléter. Sin embargo, en años recientes, se descubrió que también algunos polímeros de 2-oxazolinas tienen la propiedad de tener sensibilidad térmica, tales como, poli(isopropil-2-oxazolina), poli(n-propil-2-oxazolina), poli(etil-2-oxazolina) y poli(ciclopropil-2-oxazolina).

Los polímeros termosensibles presentan, en solución acuosa, una transición conformacional bien definida, donde las propiedades físicas cambian drásticamente en un estrecho rango de temperatura. Esta temperatura es denominada en inglés “Low critical solution temperature” (LCST). Por ejemplo, los polímeros de N-isopropilacrilamida, cuando están disueltos en agua, pasan a los 32 grados centígrados de un estado hidrofílico a un estado hidrofóbico y precipitan o se dispersan en el medio acuoso y este fenómeno es reversible, ya que, al disminuir la temperatura por debajo de los 32 °C, se disuelven nuevamente, pudiendo servir, entonces, como un “switch” o un interruptor macromolecular. Esta temperatura LCST se puede disminuir o aumentar al copolimerizar la N-isopropilacrilamida con monómeros hidrofóbicos o hidrofílicos, respectivamente, o mediante la adición de surfactantes o sales inorgánicas. Se pueden obtener temperaturas de transición cercanas a la temperatura corporal humana, abriendo la posibilidad para aplicaciones tecnológicas muy interesantes.

La transición conformacional LCST se puede utilizar en términos prácticos, por ejemplo, para elaborar hidrogeles termosensibles que puedan servir como sistemas de liberación controlada de medicamentos y fertilizantes, en ingeniería de tejidos o en válvulas y sensores para microfluidos.

En el Perú, se debe promover la investigación básica y aplicada en polímeros y, en particular, en este tipo de polímeros conmutables que tienen un potencial de alto valor agregado. Se deben formar, en nuestro país, recursos humanos especializados en los polímeros tradicionales, pero también en los polímeros funcionalizados o con propiedades especiales.

*Dr. Juan Carlos Rueda
Pontificia Universidad Católica del Perú*

ISOLATION AND STRUCTURAL ELUCIDATION OF A NEW DEPSIDE OF LICHEN *Everniopsis trulla*

Olivio Nino Castro Mandujano^{1,*}, Jesús López Rodilla², Sofia Pombal²,
Francisca Sanz González³, Julio Santiago Contreras¹

ABSTRACT

In this research, a new depside of the lichen *Everniopsis trulla* has been isolated. The extraction was carried out to 400 g of dry sample and ground with ethanol for 3 repetitions, then, it was fractionated by applying column chromatography with the CHCl₃-MeOH system and purified by recrystallization with MeOH-Acetone (1: 1); Finally, white crystals in the form of needles (solid C) with a melting point of 198 ° C were obtained, whose structure was elucidated based on spectroscopic data (UV-Visible, IR, NMR-H¹, NMR-C¹³, mass spectrometry and single crystal X-ray diffraction). According to the Science Finder databases, it is a new depside, called trullarin, and it is observed that molecular packing is influenced by both intramolecular and intermolecular forces. Intermolecular hydrogen bonds of O - H ... O type binds neighboring molecules forming dimers.

Key words: Crystal structure; Depside; *Everniopsis trulla*; Trullarin

AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE UN NUEVO DÉPSIDO DEL LIQUEN *Everniopsis trulla*

RESUMEN

En esta investigación se ha aislado a un nuevo dépsido del liquen *Everniopsis trulla*. Se realizó la extracción a 400 g de muestra seca y molida con etanol por 3 repeticiones, luego, se fraccionó aplicando cromatografía en columna con el sistema CHCl₃-MeOH y purificó por recristalización con MeOH-Acetona (1:1); finalmente se obtuvo unos cristales blancos en forma de agujas (sólido C) de punto de fusión de 198 °C, el cual se elucidó su estructura en base a los datos espectroscópicos (UV-Visible, IR, RMN-H¹, RMN-C¹³, espectrometría de masas y difracción de monocristales de rayos X). Según la base de datos de Science

¹ Facultad de Química e Ing. Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Calle Germán Amézaga 375, Lima 1, Perú. Email O. Castro: ocastro@unmsm.edu.pe; J. Santiago: jsantiagoc@unmsm.edu.pe.

² Departamento de Química, Unidade FibEnTech, Universidade da Beira Interior, 6201-001 Covilhã, Portugal. Email J. Rodilla: rodilla@ubi.pt; S. Pombal: sofia.pombal@gmail.com.

³ Servicio de Difracción de Rayos X, Universidad de Salamanca, Facultad de Ciencias, Plaza de la Merced s/n; E-37008 Salamanca, España. Email: sdrayosx@usal.es.

Finder, se trata de un nuevo dépsido, llamado trullarin y se observa que el empaquetamiento molecular está influenciado por fuerzas tanto intramoleculares como intermoleculares. Enlaces de hidrógeno intermoleculares del tipo O - H \cdots O enlaza las moléculas vecinas formando dímeros.

Palabras clave: Estructura cristalina; dépsido; *Everniopsis trulla*; trullarin.

INTRODUCTION

Biomass has become in recent years an alternative source of molecular scaffolds for the synthesis of the next generation of bioactive compounds (nutraceuticals, antioxidants, antimicrobials, insecticides, drugs or materials). The presence of one or more chiral atoms in these metabolites increases their utility in the development of new drugs. Moreover, biomass processing often generates by-products useful in other industries¹. A well-known example is the generation of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) from the dehydration of fructose. The HMF can be transformed into different furan derivatives, such as 2,5-bis (hydroxymethyl) furan, which is an optimal substrate for the manufacturing of polyurethane foam with better flame hazards properties².

Lichens are organisms widespread in nature, and are of particular interest in medicinal chemistry due to the wide variety of metabolites associated to their biomass. The use of xanthenes has been reported for the synthesis of new molecules with better antifungal properties. Likewise, usnic acid, a major metabolite identified in many lichens, has been used to generate several derivatives with antimicrobial and tuberculostatic properties^{3,4}.

Depsides are polyphenolic compounds comprising two or more monocyclic aromatic units, linked by an ester bond. They are often found in lichens, but have also been isolated from plants from the *Ericaceae*, *Lamiaceae*, and *Papaveraceae* family. Depsides have antibiotic, anti-HIV, and antiproliferative activities. As inhibitors of prostaglandin biosynthesis and leukotriene B4 biosynthesis, depsides are considered potent nonsteroidal anti-inflammatory compounds⁵.

The *Parmeliaceae* is a large and diverse family of *Lecanoromycetes*. A botanical study of all genera of *Parmeliaceae* family includes information on basic morphological characteristics for each species, but up to date there is no specific information regarding their phytochemical and pharmacological characteristics⁶. Previous research performed on the lichen *Everniopsis trulla* (Ach.) Nyl, (family *Parmeliaceae*), identified atranorin and usnic acid contained in the thallus surface. Tri-terpenes and β -orcinol depsidones were also found in its medulla⁶. In another study, the compounds chloratranorin and atranorin were identified from two extracts of *E. trulla* by TLC. The presence of two additional unknown substances was also detected⁷.

In this paper, the chemical structure of a new depside isolated from lichen *E. trulla* (Ach.) Nyl is presented, which increases the knowledge about the metabolites present in this species.

EXPERIMENTAL PART

Sample. The lichen specimen *Everniopsis trulla* (400 g) was collected in “Canchas city”, Asunción (Huaraz, Peru), in 2011 at an altitude of 3427 meters (10,650 feet). A voucher specimen was deposited in the Museum of Natural History of National University of San Marcos, UNMSM, Lima, Peru.

Extraction and isolation

The powdered sample generated from *E. trulla*, was extracted successively with ethanol. The chloroform extract was run through a chromatographic column (silica gel, CHCl₃-MeOH gradient) isolating five compounds: solid A (usnic acid), solid B (atranorin), solid C (trullarin), 2,4-dihydroxy-3-formyl-6-methylbenzoate (ethyl haematommate) and a compound still unidentified). Trullarin was purified by crystallization. Colourless single crystals were obtained by crystallization from EtOH/H₂O (mp: 198-199 °C).

RESULTS AND DISCUSSION

Usnic acid, atranorin and 2,4-dihydroxy-3-formyl-6-methylbenzoate were identified by comparison of their spectroscopic data with the literature^{9, 13, 14}.

Trullarin chemical structure elucidation

Trullarin was identified as depside through qualitative chemical reactions. This compound reacted with NaOCl and Ca(OCl)₂ in solution to give red and orange colors; It also reacted with p-phenylenediamine to give red and orange colors. This reactivity is typical of a depside with an aromatic aldehyde moiety^{8,9}. The chemical structure of trullarin was elucidated using ¹H-NMR, ¹³C-NMR, UV and IR spectroscopies. The confirmation of the structure of trullarin was accomplished by single-crystal X-ray diffraction analysis.

¹H-NMR (benzene-d₆, 400MHz): δ (ppm) 12.70, 12.65, 12.44 (each 1H, s, Ar-OH), 10.24 (1H, s, -CHO), 6.28 (1H, s, Ar-H), 3.25 (3H, s, -CO₂Me), 2.33, 2.11 (each 3H, s, Ar-Me 5 and 6), 2.23 and 2.25 (each 3H, s, Ar-Me 3' and 5'). See figure 1.

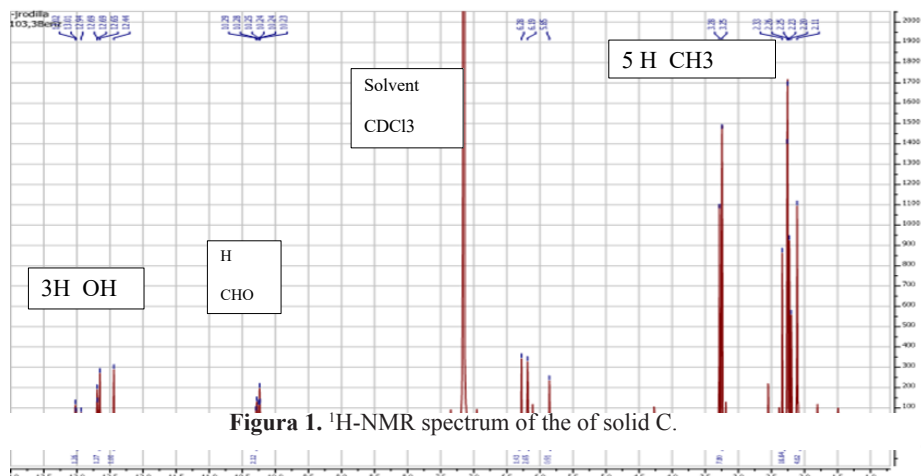


Figure 1. ¹H-NMR spectrum of the of solid C

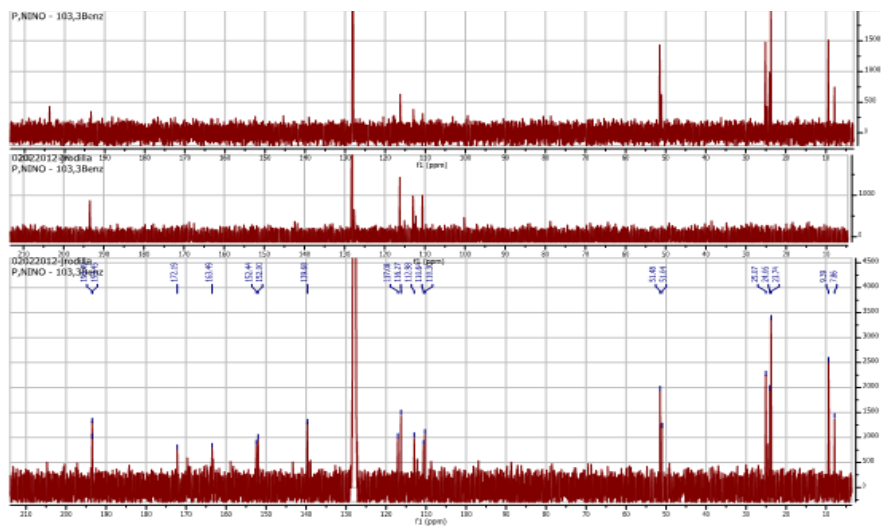


Figure 2. ¹³C-NMR spectrum and DEPT of the of solid C.

^{13}C -NMR (benzene- d_6 , 100MHz): showed five methyl groups at δ 9.4, 23.7, 24.0, 25.1 in two aromatic rings and 51.4 for the methyl ester. It also showed two carbonyl esters at δ 163.5 and 172.2 and showed an aldehyde group at δ 193.4 ppm in C-3. See figure 2.

MS: HRMS m/z 389.1624 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_8$, 389.1622).

UV: λ_{max} in ethanol 219.3 nm and 269.5 nm.

IR (KBr, cm^{-1}): 3090, 3002, 1651, 1622, 1582, 1451, 1407, 1268, 1163, 1106, 820, 802, 610.

This compound called trullarin is new according to the PUCP BASE OF SCIENCE FINDER. Its chemical name is: (Methyl-2,6-dimethyl-4'- (3-formyl-2,4-dihydroxy-5,6-imethylbenzoyloxy) -3'-hydroxy benzoate). HRESIMS (negative mode): m/z 387.1071 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ (calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_8$: 387.1080). The title compound named trullarin, $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_8$, crystallizes with one molecule in the asymmetric unit in the monoclinic centrosymmetric space group $\text{P}2_1/\text{n}$ with the following unit cell parameters: $a = 11.0400(3)$ Å, $b = 11.2752(3)$ Å, $c = 14.7893(4)$ Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 109.074(2)^\circ$, $V = 1739.87(8)$ Å 3 , $Z = 4$. Figure 3 shows the molecular structure in solid state, in which the individual conformation of trullarin can be observed. The crystallographic data is presented in Table 1. Selected bond lengths and angles are given in Table 2. All the bond lengths and angles are within the normal ranges.

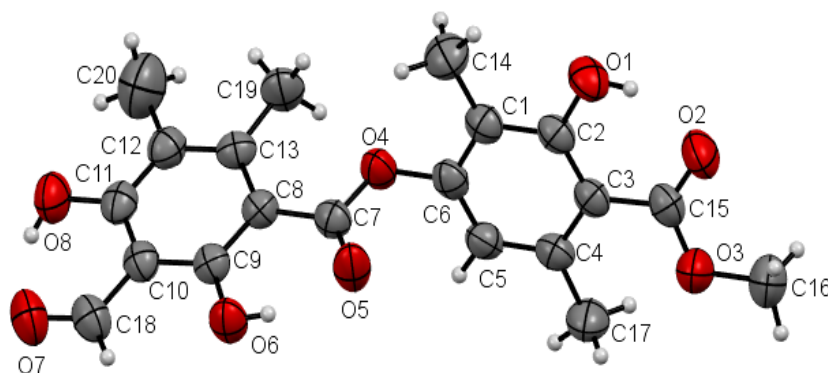


Figura 2. Molecular structure of trullarin.

Table 1. Crystallographic data for C₂₀H₂₀O₈.

CCDC	1508526
Empirical formula	C ₂₀ H ₂₀ O ₈
Formula weight	388.36
Temperature (K)	298(2)
Wavelength (Å)	1.54178
Crystal system	Monoclinic
Space group	P2 ₁ /n
Unit cell dimensions	
a (Å)	11.0400(3)
b (Å)	11.2752(3)
c (Å)	14.7893(4)
α [°], β [°], γ [°]	90, 109.074(2), 90
Volume (Å ³), Z	1739.87(8), 4
Density (calculated (Mgm ⁻³))	1.483
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.975
F(000)	816
Crystal size (mm)	0.15 x 0.10 x 0.08
Range for data collection θ (°)	4.38 to 66.90
Limiting indices h, k, l	-13 ≤ h ≤ 13, -12 ≤ k ≤ 13, -17 ≤ l ≤ 14
Reflections collected	11153
Independent reflections	2934 (R _(int) = 0.0312)
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	2934 / 0 / 262
Goodness-of-fit on F ²	1.065
Final R indices [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0678, wR ₂ = 0.2309
R indices (all data)	R ₁ = 0.0819, wR ₂ = 0.2556
Largest diff. peak and hole	0.270 y -0.765

Tabla 2. Selected bond lengths (Å) and bond angles (°) for C₂₀H₂₀O₈.

Bond	Length (Å)	Diedral angles	Angles (°)
O(1)-C(2)	1.353(3)	C(15)-O(3)-C(16)	117.3(3)
O(2)-C(15)	1.227(4)	C(7)-O(4)-C(6)	117.8(2)
O(3)-C(15)	1.308(4)	O(1)-C(2)-C(3)	122.6(3)
O(3)-C(16)	1.449(4)	O(1)-C(2)-C(1)	115.0(2)
O(4)-C(7)	1.345(3)	C(1)-C(6)-O(4)	117.4(3)
O(4)-C(6)	1.414(3)	C(5)-C(6)-O(4)	118.5(3)
O(5)-C(7)	1.212(3)	O(5)-C(7)-O(4)	120.7(3)
O(6)-C(9)	1.328(3)	O(5)-C(7)-C(8)	124.3(2)
O(7)-C(18)	1.227(4)	O(4)-C(7)-C(8)	115.0(2)
O(8)-C(11)	1.336(3)	O(6)-C(9)-C(10)	115.3(2)
C(7)-C(8)	1.468(4)	O(6)-C(9)-C(8)	123.5(3)
		O(8)-C(11)-C(12)	118.9(3)
		O(8)-C(11)-C(10)	120.8(3)
		O(2)-C(15)-O(3)	121.7(3)
		O(2)-C(15)-C(3)	122.7(3)
		O(3)-C(15)-C(3)	115.6(2)
		O(7)-C(18)-C(10)	123.4(3)

The planar conformation of the ester groups is established from the torsion angles O3-C15-O2-C3 = -178.5(5) and O4-C7-O5-C8 = 179.3(5). The hydroxyl groups are coplanar with the aromatic rings; the O1—C2—C1—C6, O6—C9—C10—C11 and O8—C11—C12—C13 torsion angles are -179.9 (3)°, 179.5 (3)° and -179.6 (3)°, respectively.

In the crystal structure of trullarin, there are two benzene rings in the molecule. C(1), C(2), C(3), C(4), C(5) and C(6) form the first plane, with a mean deviation of 0.0167 Å, defined as plane I. Similarly, C(8), C(9), C(10), C(11), C(12) and C(13) forms the second plane with a mean deviation of 0.0048 Å, defined as plane II. The dihedral angle between plane I and plane II is 64.4(9)°. In addition, the ester group C(7), C(8), O(4) and O(5) forms a third plane, defined as plane III. The dihedral angle between plane II and plane III is 4.3(1)°, which suggests that both are nearly co-planar. This indicates that there is a π - π conjugation between the C(=O) group and the benzene ring of plane II^{15, 16}.

The molecular packing of trullarin is influenced by both intramolecular and intermolecular forces. Intramolecular forces determine molecular shape, which in turn play an important

role in determining the most effective ways of packing the molecules in the crystal [13]. In the structure, there are three intramolecular hydrogen bonds of O—H···O type. The O1···O2, O5···O6 and O7···O8 intramolecular hydrogen bonds generate a six-membered rings (Table 3 and Fig. 4). Furthermore, one intermolecular hydrogen bond of O—H···O type, O5···O6, links adjacent molecules into dimers (Table 3 and Fig. 4). The dimers form twelve-membered rings and present an anti-parallel orientation along an axis. The packing diagram in Fig. 5 shows the stacking pattern of trullarin, viewed along the [010] direction. The chemical structure obtained by single crystal XRD agrees very well with NMR spectroscopy data.

Tabla 3. Intra- and Intermolecular hydrogen bonds geometry (Å, °) for C₂₀H₂₀O₈.

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
O1—H1···O2 ⁱ	0.82	1.81	2.540(3)	147
O6—H6···O5 ⁱ	0.82	1.83	2.541(3)	144
O8—H8···O7 ⁱ	0.82	1.83	2.554(4)	146
O6—H6···O5 ⁱⁱ	0.82	2.52	3.088(3)	127

Symmetry codes: (i) = x, y, z (ii) = 1-x, 1-y, -z

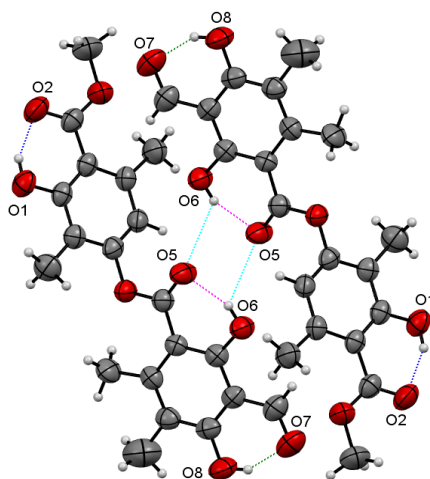


Figura 4. Intermolecular hydrogen bonding in trullarin.

The chemical structure obtained by single crystal XRD aligns very well with NMR spectroscopy data. Figure 6, shows the chemical structure of the isolated new compound from E. trulla.

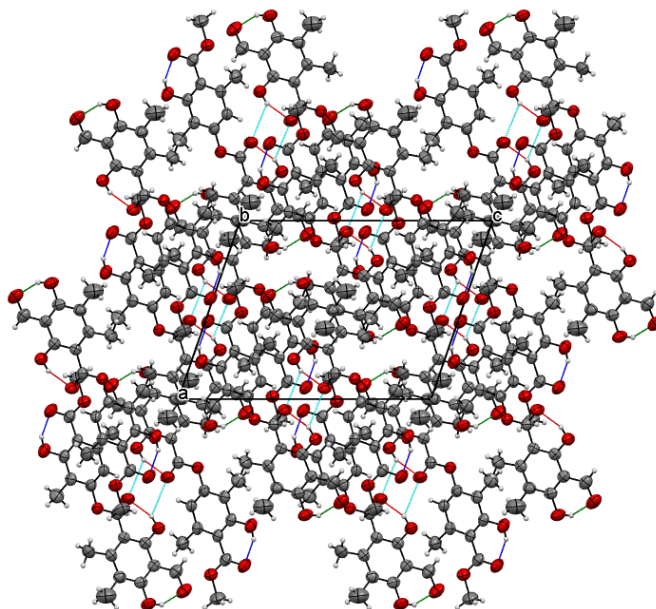


Figura 5. Stacking pattern in trullarin.

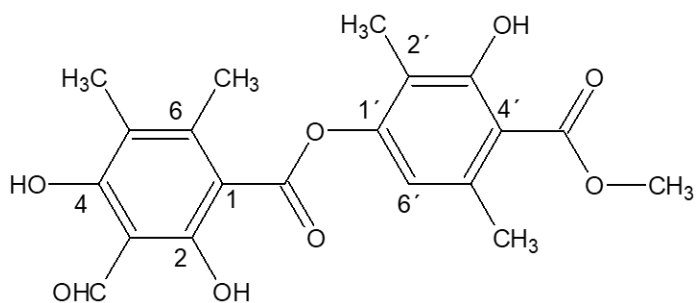


Figura 6. Chemical structure of trullarin.

CONCLUSIONS

Four compounds were isolated from the Peruvian Lichen *E. trulla*. One of them, compound C (trullarin), is reported for the first time. Has melting point of 198 ° C were obtained, whose structure was elucidated based on spectroscopic data (UV-Visible, IR, NMR-H¹, NMR-C¹³, mass spectrometry and single crystal X-ray diffraction) and its chemical name is: (Methyl-2,6-dimethyl-4'-(3-formyl-2,4-dihydroxy-5,6-imethylbenzoyloxy)-3'-hydroxy benzoate).

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Dieu A, Millot M, Champavier, Mambu L, Chaleix V, Sol V, Gloaguen V. Uncommon chlorinated xanthone and other antibacterial compounds from the lichen *Cladonia incassate*. *Planta Med.* 2014; 80(11): 931-935.
2. Resende D, Pereira-Terra P, Inácio PS, Martins da Costa P, Pinto E, Sousa E, Pinto M. Lichen Xanthones as Models for New Antifungal Agents. *Molecules*, 2018; 23(10):2617. doi: 10.3390/molecules23102617.
3. Bruno M, Trucchi B, Burlando B, Ranzato E, Martinotti S, Küpeli Akkol E, et al. (+)-Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. *Bioorg Med Chem.* 2013; 21(7): 1834-1843.
4. Barrera Tomas M, Tomas Chota G, Sheen Cortavarría P, Fuentes Bonilla P, Inocente Camones MA, Santiago Contreras J. Synthesis of acyl-hydrazone from usnic acid and isoniazid and its anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. *Rev Colomb Quím.* 2017; (46):17-21.
5. Reynertson K, Wallace A, Adachi S, Gil R, Yang H, Basile M, et al. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *J Nat Prod.* 2003; 69:1228-1230.
6. Elix JA. Progress in the Generic Delimitation of *Parmelia* Sensu Lato Lichens (Ascomycotina: Parmeliaceae) and a Synoptic Key to the Parmeliaceae. *The Biologist.* 1993; 96(3): 359-383.
7. Ramaut JL, Brouers M, Serusiaux E, Corvisier M. Separation of mixtures of atranorin and chloroatranorin by thin-layer chromatography. *J Chromatogr.* 1978; 155: 450-453.
8. Honda NK, Vilegas W. The chemistry of lichens. *Quim Nova.* 1999; 22:110-125.
9. Huneck S, Yoshimura I. Identification of lichen substances. Berlin: Springer; 1996.
10. Sheldrick GM. SHELXTL/PC User Manual. Madison, Wisconsin, USA.: Siemens Analytical X-ray Instruments Inc.; 1990.
11. Sheldrick GM. SHELXS97 and SHELXL97. Göttingen, Germany: University of Göttingen, Germany; 1997.
12. Macrae CF, Edgington PR, McCabe P, Pidcock E, Shields GP, Taylor R, et al. Mercury: visualization and analysis of crystal structures. *J Appl Cryst.* 2006; 39:453-457.
13. Cansaran D, Kahya D, Yurdakulol E, Atakol O. Identification and Quantitation of Usnic Acid from the Lichen *Usnea* Species of Anatolia and Antimicrobial Activity. *Z Naturforsch.* 2006; 61c: 773-776.
14. Carvalho M, Carvalho G, Braz-Filho R. Chemical Constituents from *Ouratea floribunda*: Complete ¹H and ¹³C NMR Assignments of Atranorin and its New Acetyl Derivative. *J Braz Chem Soc.* 2000; 11(2):143-147.
15. Lv PC, Wang KR, Mao WJ, Fang RQ, Chen J, Xiong J, Zhu HL Synthesis and Crystal Structure of a Depside Derivative 2-(2-Methoxy-2-oxoethyl)phenyl 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)acetate. *J Chem. Crystallogr.* 2009; 39:927-930.
16. Lv PC, Wang KR, Mao WJ, Fang RQ, Chen J, Xiong J, Zhu HL Synthesis, characterization and structure-activity relationship analysis of novel depsides as potential antibacterials. *Eur J Med Chem.* 2009; 44:1779-1787.
17. Wright JD. *Molecular Crystals* University of Kent at Canterbury. Cambridge, UK.: Cambridge University Press; 1995.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE HOJAS DE *Buddleja inkana*, *Oreocallis grandiflora* y *Chuquiraga spinosa*

Karen Tufinio Miranda^a, Harold Ames Canchaya^a, Abel Vergara Sotomayor^a,
Alejandro Fukusaki Yoshizawa^b, Karin Paucar Cuba^{*a}

RESUMEN

A fin de poder usar extractos de plantas nativas en aplicaciones medicinales, cosméticas, anticorrosivas, entre otras; el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antioxidante, así como el contenido de flavonoides y compuestos fenólicos totales de los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de las hojas de *Buddleja inkana* (quisuar), *Oreocallis grandiflora* (cucharilla) y *Chuquiraga spinosa* (huamanpinta). La medición de la actividad antioxidante: FRAP, DPPH y ABTS^{•+} así como el contenido de flavonoides y compuestos fenólicos totales, se realizó por el método de lector en microplaca. Los resultados obtenidos al evaluar la actividad antioxidante de los extractos en etanol absoluto y en soluciones hidroalcohólicas al 75 y 50 % (v/v) en etanol mostraron que los extractos de la *Oreocallis grandiflora* presentaron una mayor actividad antioxidante comparados con los extractos de la *Buddleja inkana* y *Chuquiraga spinosa*, y que los extractos hidroalcohólicos al 75 % (v/v) de etanol fueron los extractos con la mayor actividad antioxidante, probablemente asociado al solvente y a que dichos extractos presentaron también mayores concentraciones de compuestos fenólicos totales.

Palabras clave: *Buddleja inkana*, *Oreocallis grandiflora*, *Chuquiraga spinosa*, antioxidantes, flavonoides, fenoles.

DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Buddleja inkana*, *Oreocallis grandiflora* and *Chuquiraga spinosa* LEAF EXTRACTS

ABSTRACT

In order to use native plant extracts in medicinal, cosmetic, anticorrosive and other applications; the objective of these work was to evaluate the antioxidant activity, as well as the content of flavonoids and total phenolic compounds of the ethanolic and hydroalcoholic

^a Laboratorio de Corrosión. Facultad de Ingeniería Química y Textil. Universidad Nacional de Ingeniería-UNI. Av. Túpac Amaru N°210. Lima 25. kpaucar@uni.edu.pe.

^b Laboratorio de Química y Bioquímica de Productos Naturales. Universidad Científica del Sur-UCSUR.

extracts of the leaves of *Buddleja inkana* (quisuar), *Oreocallis grandiflora* (cucharilla) and *Chuquiraga spinosa* (huamanpinta). The measurement of antioxidant activity: FRAP, DPPH and ABTS^{•+}, as well as the content of flavonoids and total phenolic compounds, was carried out by the microplate reader method. The results when evaluating the antioxidant activity of ethanolic and hydroalcoholic solutions at 75 and 50 % (v/v) in ethanol extracts showed that the extracts of *Oreocallis grandiflora* showed a higher antioxidant activity than *Buddleja inkana* and *Chuquiraga spinosa*, and that the hydroalcoholic extracts at 75 % (v/v) ethanol were the extracts with high antioxidant activity, probably associated with the solvent, since these extract also presented the highest concentrations of total phenolic compounds.

Key words: *Buddleja inkana*, *Oreocallis grandiflora*, *Chuquiraga spinosa*, antioxidants, flavonoids, phenols.

INTRODUCCIÓN

En el Perú, la identificación e investigación en los usos de plantas nativas es todavía incipiente en comparación a la extensa flora con la que contamos debido a nuestra diversidad geográfica y climática; lo cual motiva a profundizar su estudio. Con la finalidad de poder valorar sus propiedades e importancia, la mayor parte de investigaciones se basan en la búsqueda de plantas con propiedades alimenticias, medicinales, anticorrosivas, entre otras^{1,2}. La actividad antioxidante de sus extractos y/o sus fracciones, es muy estudiada en farmacología y se ha visto su relación con el contenido de fenoles y flavonoides presentes en algunas plantas³.

Por otro lado, los ensayos para la determinación de la actividad antioxidante pueden clasificarse según la naturaleza del mecanismo sobre el cual los antioxidantes neutralizan los radicales libres; de esta forma, existen ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno y ensayos basados en la transferencia de electrones. A este segundo tipo pertenecen los análisis TEAC (Capacidad antioxidante de equivalentes TROLOX), FRAP (parámetro antioxidante de la reducción del ion férrico), DPPH (2,2-difenil-2-picrihidrazil), capacidad de reducción del cobre II y ensayo de fenoles totales por reactivos de Folin Ciocalteu.

Los métodos espectroscópicos basados en la transferencia de electrones, miden la capacidad de un antioxidante de reducir un agente oxidante, ocurriendo generalmente un cambio de color (el cambio de color es directamente proporcional a la concentración de los antioxidantes de la muestra) sobre el compuesto reducido, los casos más representativos son la pérdida de color de los ensayos realizados con el DPPH⁴ y el radical catión ABTS^{•+}⁵. El objetivo del presente estudio fue determinar el contenido de flavonoides, compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de tres plantas nativas: *Buddleja inkana*, *Oreocallis grandiflora* y *Chuquiraga spinosa*, con fines medicinales, cosméticos, anticorrosivos, etc., se aplicó el método de microplaca para la determinación de flavonoides, fenoles totales y los ensayos de inhibición de radicales FRAP, DPPH y ABTS^{•+}⁶.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de las muestras

La muestra de *Buddleja inkana* Ruiz & Pav., de la familia Loganiaceae (quisuar); fue recolectada en la provincia de Canta (Lima) e identificada por el biólogo Severo Baldeón Malpartida (constancia No. 072-USM-2018). La muestra de *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br., de la familia Proteaceae, fue recolectada en marzo del 2018 en la carretera Tiambra, hacia arriba de la quebrada, km 14 desde Huasahuasi, provincia de Tarma (Junín). Es un arbusto de 1-2 m de alto, con flores de color rosado fucsia y su hábitat es matorral; fue identificada por la bióloga Asunción Cano Echevarría (constancia No. 071-USM-2018). La muestra de *Chuquiraga spinosa* Less "huamanpita", de la familia Astereaceae, fue recolectada en febrero del 2018 en el distrito de Huaros, provincia de Canta (Lima). Es un arbusto espinoso con 0,5-1,5 m de alto, flores anaranjadas, crece en matorral en zona rocosa dominada por arbustos de *Baccharis* sp. y *Lupinus* sp.; fue identificada en el Museo de Historia Natural de la UNMSM por el biólogo Severo Baldeón Malpartida (constancia No. 070-USM-2018).

Obtención de los extractos

Para la preparación de los extractos se seleccionó solo las hojas de la muestra bruta de cada planta: *Buddleja incana*, *Oreocallis grandiflora* y *Chuquiraga spinosa*. Para la extracción por maceración las hojas fueron limpiadas, secadas bajo sombra durante 21 días, molidas con un molino de mano y tamizadas en tamiz N° 40. Para la extracción se utilizó 50 g de la muestra molida en 100 mL de solvente, es decir, etanol absoluto y soluciones hidroalcohólicas al 75 y 50 % (v/v) en etanol. La maceración se realizó en caliente a 40 °C durante 4 días, en este periodo de tiempo la muestra se sonicó y filtró 5 veces, las primeras por gravedad usando papel filtro rápido y la última por filtración al vacío; al cuarto día se obtuvo el extracto líquido que fue secado en una estufa a 40 °C hasta obtener el extracto sólido. Los extractos, así obtenidos, fueron utilizados para realizar las pruebas de actividad antioxidante: FRAP, DPPH y ABTS^{·+}, así como la determinación de flavonoides y compuestos fenólicos totales.

Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico, conocido también como marcha fitoquímica, es un método cualitativo que permite identificar, de manera preliminar, los diferentes componentes o metabolitos secundarios presentes en una planta. El tamizaje fitoquímico de las tres plantas se realizó usando 10 g de las hojas secas, molidas y tamizadas de cada planta y siguiendo los procedimientos descritos por Lock7 para la identificación de metabolitos en cada planta.

Determinación de antioxidantes

Se empleó como solvente al metanol absoluto, se preparó 3 mL de la solución de cada extracto de las plantas: *Buddleja inkana*, *Oreocallis grandiflora* y *Chuquiraga spinosa* a una concentración de 5 mg/mL en metanol. Se pesó 150 mg de cada muestra, se llevó al ultrasonido por 5 min, después se introdujo en un vórtex. Las plantas con su respectiva concentración en etanol e hidroalcohólicas se identificaron; en etanol absoluto: *Buddleja inkana* (B ABS.), *Oreocallis grandiflora* (O ABS.), y *Chuquiraga Spinosa* (C ABS.), al 75 % (v/v) en etanol: *Buddleja inkana* (B 75), *Oreocallis grandiflora* (O 75) y *Chuquiraga spinosa*

(C 75) y al 50 % (v/v) en etanol: *Buddleja inkana* (B 50), *Oreocallis grandiflora* (O 50) y *Chuquiraga spinosa* (C 50). Las mezclas, ya disueltas, se pasaron por un filtro de 22 μm y se realizó las pruebas de FRAP, DPPH, ABTS \cdot^+ , flavonoides y compuestos fenólicos totales⁸.

Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP), en lector de micro placa (modificado para etanol): Este ensayo se basa en la capacidad de reducir el ion Fe^{+3} a Fe^{+2} en presencia del TPTZ (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) formando un complejo azul intenso de Fe-TPTZ con una absorbancia máxima de 593 nm. La absorbancia es proporcional al contenido de antioxidantes.

Para el ensayo se mezcló 290 μL de solución de trabajo (preparada a partir de 1 mL de solución tampón 300 mM (3,1g de $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 16 mL de ácido acético glacial), 1 mL de 20 mM $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en solución acuosa en 0,02M HCl, 1 mL de 10 mM TPTZ disuelto en etanol y 11 mL de etanol) y 10 μL de muestra en un pocillo de microplaca, se esperó 15 min y se midió la absorbancia a 593 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado. La curva de calibración se obtuvo usando una solución de Trolox, ver figura 1. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de Trolox/g de planta.

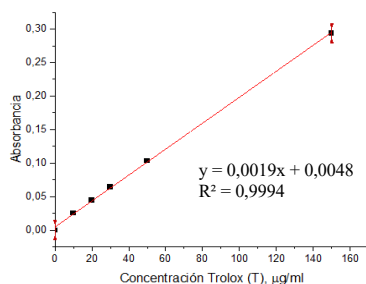


Figura 1. Curva de calibración de Trolox.

Inhibición frente al radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) en lector de micro placa: Para el ensayo se mezcló 150 μL de disolución de 400 μM DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) en metanol y 50 μL de la muestra en un pocillo de microplaca, se esperó 30 minutos y se midió la absorbancia a 515 nm. Las muestras se midieron por triplicado. Se empleó como estándar de control el ácido gálico.

Decoloración del radical ABTS \cdot^+ (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) en lector de micro placa: Para el ensayo, se prepararon 5 mL de solución acuosa 7 mM de ABTS 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) y 5 mL de solución acuosa 2,45 mM de persulfato de potasio, las cuales luego se mezclaron en proporciones (1:1) y se dejó incubar por 16 h en oscuridad, generando una disolución color verde cuya absorbancia se midió a 734 nm. Una alícuota de dicha solución se diluyó con una solución

tampón fosfato salino hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0,7. Para el ensayo se mezcló 275 μL de dicha solución y 25 μL de muestra en un pocillo de microplaca y luego de 5 min de reacción se midió la absorbancia a 734 nm. Se usó como estándar de control el ácido gálico.

La ecuación 1 permite calcular el porcentaje de actividad antioxidante (AA) de los extractos para los ensayos DPPH y ABTS.⁺:

$$AA (\%) = \left[\frac{\text{Abs. control} - (\text{Abs. extracto con reactivo} - \text{Abs. extracto sin reactivo})}{\text{Abs. control}} \right] \times 100 \quad (1)$$

En base a las curvas de concentración vs. porcentaje de actividad antioxidante se obtuvieron los coeficientes de inhibición al 50 % de actividad, IC_{50} , de los extractos y del estándar control. La determinación del porcentaje de actividad antioxidante relativa (% AAR) de los extractos de hojas para los ensayos DPPH y ABTS se realizó usando la ecuación 2:

$$AAR (\%) = IC_{50 (M)} / IC_{50 (R)} * 100 \quad (2)$$

Donde:

$IC_{50 (M)}$: Coeficiente de inhibición de la muestra.

$IC_{50 (R)}$: Coeficiente de inhibición del estándar de control.

Flavonoides en lector de micro placa: Los flavonoides son los más comunes antioxidantes, el estándar a comparar fue la quercetina, ver figura 2. Para el ensayo se mezcló 160 μL de solución acuosa de NaNO_2 0,85 % p/v y 30 μL de muestra en un pocillo de la microplaca y se esperó 6 min. Se agregó 18 μL de solución acuosa de AlCl_3 10 % y se esperó 5 min. Posteriormente se agregó 120 μL de mezcla básica (preparada usando 1 mL de etanol absoluto con 3,1 mL de NaOH 0,645 M). Se homogenizó la mezcla mediante pipeteo y se midió inmediatamente la absorbancia a 510 nm. Las muestras se midieron por triplicado. Los resultados fueron expresados en mg quercetina equivalente (AG)/ g de planta.

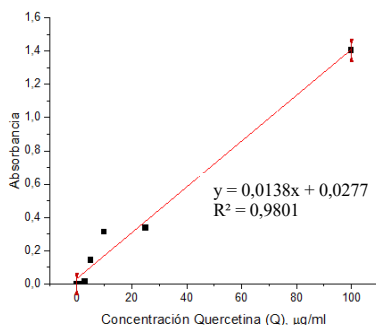


Figura 2. Curva de calibración de Quercetina.

Fenoles totales en lector de micro placa: Para el ensayo se mezcló 165 μL de solución de reactivo Folin-Cicalteu (preparada usando 1 mL del reactivo en 139 mL de agua) con 15 μL de muestra en un pocillo de microplaca, se esperó 5 min. Se agregó 120 μL de solución acuosa de Na_2CO_3 7 % p/v y se midió a 750 nm. Se realizó la curva de calibración con una solución alcohólica de ácido gálico (AG), ver figura 3. Los resultados fueron expresados en mg ácido gálico equivalente (AG)/ g de planta. Este procedimiento se efectuó por triplicado con cada uno de los extractos.

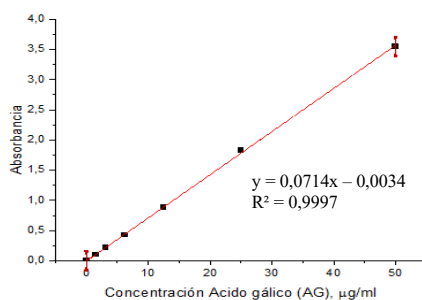


Figura 3. Curva de calibración de ácido gálico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de los extractos

La cantidad de extracto obtenido para cada planta en solución fue: 2,8, 4,7 y 2,5 g para B ABS., B 75 y B 50, respectivamente; 1,7, 1,9 y 4,1 g, para O ABS., O 75 y O 50, respectivamente; 1,5, 2,5 y 1,5 g, para C ABS., C 75 y C 50, respectivamente. En general, la *Buddleja inkana* fue la planta que mostró la mayor extracción con los diferentes solventes y que los solventes hidroalcohólicos favorecieron la extracción de metabolitos, probablemente debido a la solubilidad de algunos metabolitos en presencia de agua.

Tamizaje fitoquímico

Los resultados obtenidos en la determinación de la composición química de las distintas fracciones de cada una de las plantas estudiadas se muestran en la tabla 1. El tamizaje fitoquímico mostró la presencia de fenoles, taninos, esteroides, triterpenoides, alcaloides, saponinas y leucoantocianinas, metabolitos que pueden ser usados en diversas aplicaciones^{1,2}.

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico.

Hojas de la planta	Metabolitos secundarios
<i>Buddleja inkana</i>	Componentes fenólicos, taninos, saponinas, triterpenoides, alcaloides.
<i>Oreocallis grandiflora</i>	Componentes fenólicos, taninos, flavonoides, saponinas, triterpenoides, estereoides, leucoantocianinas, alcaloides.
<i>Chuquiraga spinosa</i>	Componentes fenólicos, flavonoides, alcaloides, leucoantocianinas.

Actividad antioxidante

Ensayo de FRAP (Ferric reducing ability power)

Los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de la *Buddleja inkana* y *Oreocallis grandiflora*, mostraron una intensa coloración azul debido a la formación del complejo mientras que los extractos de *Chuquiraga spinosa* el cambio de coloración no fue observada a simple vista, lo cual guarda relación con el mayor rendimiento de los extractos, así como en los valores de actividad antioxidante reportados en la tabla 2. Los extractos con la mayor actividad antioxidante, en todos los casos, fueron los extractos hidroalcohólicos B 75, O 75 y C 75 con valores de 1997,78, 1317,53, y 56,98 mg trolox/g planta, respectivamente.

El mayor valor de la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos en comparación con los etanólicos podría atribuirse al solvente de extracción utilizado, es decir, que la mezcla de solventes (etanol/agua), en ciertas composiciones, favorecen la extracción de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes. Otros estudios realizados en extractos metanólicos de las hojas de la *Buddleja saligna* reportaron valores de actividad antioxidante FRAP de 490,98 $\mu\text{mol Fe (II)/g}$ de muestra⁹.

Tabla 2. Actividad antioxidante FRAP de extractos etanólicos e hidroalcohólicos de *Buddleja inkana*, *Oreocallis grandiflora* y *Chuquiraga spinosa*.

planta/solvente	Actividad antioxidante (mg trolox/g muestra)
B ABS.	899,56 \pm 0,01
B 75	1997,78 \pm 0,01
B 50	941,78 \pm 0,01
O ABS.	1106,97 \pm 0,03
O 75	1317,53 \pm 0,04
O 50	870,73 \pm 0,01
C ABS.	10,04 \pm 0,01
C 75	56,98 \pm 0,01
C 50	25,20 \pm 0,01

Ensayo DPPH

En la tabla 3, se muestra los IC₅₀ y el AAR (%) de los extractos etanólicos e hidroalcohólicos estudiados, así como del estándar control, evidenciando que los extractos hidroalcohólicos O 75, B 75 y C 75 exhiben una mejor actividad antioxidante por este método comparado con los demás extractos estudiados.

En particular, la actividad antioxidante por DPPH de los extractos de *Oreocallis grandiflora* fue mayor que la exhibida por los extractos de *Buddleja inkana*. Comparando los valores de IC₅₀ para los extractos estudiados, el valor de 25,26 µg/mL fue el más bajo alcanzado por el extracto O 75. Sin embargo, no tiene una buena capacidad antioxidante respecto al estándar patrón de ácido gálico.

Los extractos que mostraron la mayor actividad antioxidante relativa fueron los extractos O 75 y O ABS., con valores de 432,67 % y 632,75 %, respectivamente; verificando que estos menores valores exhiben una mayor capacidad de captar los radicales libres.

Ensayos de DPPH a extractos etanólico de la *Buddleja saligna*¹⁰, metanólico de la *Buddleja globosa*¹¹ e hidrofénil etil vainillato de la *Buddleja salvifolia*¹² han reportado valores de IC₅₀ de 8,16, 8,40 y 84,03 µg/mL, respectivamente; todos estos valores difieren del solvente, especies y partes de plantas usadas pertenecen a la familia de la *Buddleja inkana*, la cual tiene aún estudios incipientes.

Tabla 3. Coeficiente de inhibición, IC₅₀, y Actividad antioxidante relativa (AAR) mediante DPPH de los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de *Buddleja inkana*, *Oreocallis grandiflora* y *Chuquiraga spinosa*.

planta/solvente	IC ₅₀ (µg/mL)	AAR (%)
B ABS.	72,84 ± 0,01	1247,58
B 75	62,39 ± 0,01	1068,59
B 50	67,02 ± 0,03	1147,89
O ABS.	36,94 ± 0,01	632,75
O 75	25,26 ± 0,01	432,67
O 50	122,14 ± 0,02	2091,83
C ABS.	3439,09 ± 0,01	58899,71
C 75	773,28 ± 0,01	12558,59
C 50	1361,61 ± 0,01	23319,72
Ácido Gálico	5,83 ± 0,04	---

Otros estudios realizados a extractos metanólicos de la *Oreocallis grandiflora*¹³ reportaron, en ensayos DPPH, valores de IC₅₀ de 15 µg/mL concentraciones menores a las obtenidas para los extractos estudiados. Por otro lado, estudios realizados a extractos etanólicos de *Chuquiraga spinosa*¹⁴ y metanólicos de *Chuquiraga spinosa*¹⁵, reportaron resultados con una mayor actividad antioxidante, con valores de actividad antioxidante, IC₅₀, de 14,98 y 36,51

µg/mL, respectivamente. El menor valor de IC₅₀ probablemente se encuentre relacionado con las condiciones de extracción, lugar de origen, entre otros.

Ensayo de ABTS⁺⁺

En la tabla 4 se muestra los IC₅₀ y AAR (%) de los extractos estudiados, así como del estándar control, evidenciando que los extractos O 75, B 75 y C 75, al igual que en el ensayo DPPH, exhiben una mejor actividad antioxidante comparado con los demás extractos estudiados. De forma similar a lo evidenciado en los ensayos anteriores, la actividad antioxidante por ABTS de los extractos de *Oreocallis grandiflora* fue mayor que la exhibida por los extractos de *Buddleja inkana*. Comparando los valores de IC₅₀ para los extractos estudiados, el valor de 4,69 µg/mL fue el más bajo alcanzado para el extracto O 75. Sin embargo, no tiene una buena capacidad antioxidante respecto al estándar patrón de ácido gálico. Los extractos que mostraron la mayor actividad antioxidante relativa fueron los extractos O 75 y O ABS., con valores de 9,60 y 10,84 %, respectivamente; verificando que a menor valor mayor capacidad antioxidante.

Tabla 4. Coeficiente de inhibición, IC₅₀, y Actividad antioxidante relativa (AAR) mediante ABTS de los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de *Buddleja inkana*, *Oreocallis grandiflora* y *Chuiraga spinosa*.

planta/solvente	IC ₅₀ (µg/mL)	AAR (%)
B ABS.	8,33 ± 0.01	17,06
B 75	6,54 ± 0.01	13,38
B 50	7,25 ± 0.01	14,82
O ABS.	5,30 ± 0.01	10,84
O 75	4,69 ± 0.01	9,60
O 50	11,31 ± 0.01	23,14
C ABS.	90,07 ± 0.01	184,23
C 75	37,13 ± 0.01	75,96
C 50	52,08 ± 0.01	106,53
Ácido Gálico	0,48 ± 0.01	---

Los valores de AAR (%) reportados para extractos metanólicos y etanólicos de la *Calamintha grandiflora*¹⁶, especie perteneciente a la misma división y especie de la *Oreocallis grandiflora*, fueron de 18,67 y 23,56 %, respectivamente; indicando una mayor actividad antioxidante que los extractos de hojas de la *Oreocallis grandiflora*.

En la figura 4, se muestra que los valores de la concentración de los extractos para IC₅₀ calculados por el ensayo de DPPH son mayores que los calculados para el ensayo de ABTS⁺⁺. El ensayo ABTS muestra una mayor sensibilidad a la actividad antioxidante. Los extractos O 75 y O ABS. mostraron los valores de IC₅₀ más bajos para ABTS⁺⁺ y una mayor actividad antioxidante por ambos métodos.

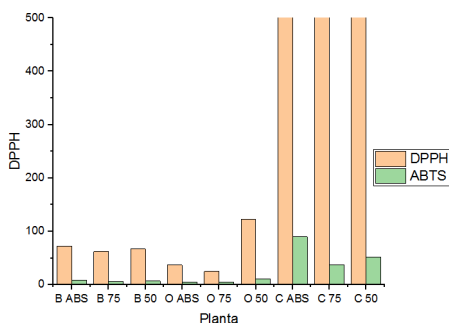


Figura 4. Actividad antioxidante por ensayos de DPPH y ABTS⁺⁺.

Contenido de flavonoides y fenoles totales

En la tabla 5, se muestra los resultados obtenidos en la medición del contenido de flavonoides. Los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de la *Buddleja inkana* mostraron de 2 a 3 veces mayor el contenido de flavonoides que los extractos de *Oreocallis grandiflora* y *Chuquiraga spinosa*.

Tabla 5. Contenido de flavonoides de extractos etanólicos e hidroalcohólicos de *Buddleja inkana*, *Oreocallis grandiflora* y *Chuquiraga spinosa*.

planta/solvente	Absorbancia	Desv. Estándar	Flavonoides mg Quercetina/g planta
B ABS.	1,58	0,09	210,68 ± 0,09
B 75	1,66	0,07	369,24 ± 0,07
B 50	1,02	0,10	118,52 ± 0,10
O ABS.	0,53	0,01	39,97 ± 0,01
O 75	0,74	0,01	65,14 ± 0,01
O 50	0,18	0,09	31,44 ± 0,09
C ABS.	0,50	0,04	34,14 ± 0,04
C 75	0,96	0,28	111,11 ± 0,28
C 50	0,10	0,16	5,51 ± 0,16

En la tabla 6, se muestra los resultados obtenidos en la medición del contenido de fenoles totales. Los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos al 75 % (v/v) de etanol de las tres plantas en estudio mostraron los mayores contenidos de flavonoides y polifenoles totales, resultado que mantiene correlación con la elevada actividad antioxidante reportada en los ensayos FRA, DPPH y ABTS⁺⁺.

Tabla 6. Contenido de fenoles totales de extractos etanólicos e hidroalcohólicos de *Buddleja inkana*, *Oreocallis grandiflora* y *Chuquiraga spinosa*.

planta/solvente	Absorbancia	Desv. Estándar	Fenoles totales mg Ácido Gálico/g planta
B ABS.	1,75	0,05	91,77 ± 0,05
B 75	1,97	0,10	172,58 ± 0,10
B 50	1,79	0,10	82,29 ± 0,10
O ABS.	2,94	0,10	89,88 ± 0,10
O 75	2,65	0,02	93,09 ± 0,02
O 50	1,02	0,06	78,46 ± 0,06
C ABS.	0,34	0,05	9,63 ± 0,05
C 75	0,54	0,01	24,89 ± 0,01
C 50	0,29	0,01	8,50 ± 0,01

El contenido de fenoles para extractos metanólicos de la *Oreocallis grandiflora*¹³ reportaron valores de 17,4 mg Ácido Gálico/100 mg de extracto, este resultado es tres veces menor al obtenido para el extracto etanólico en estudio. Otros estudios de contenido de flavonoides realizados solo a extractos etanólicos al 96 % de hojas de *Chuquiraga spinosa*¹⁷ obtuvieron como resultado 80 mg quercetina/g y en el extracto de estudio se obtuvo entre 5,51 y 111,11 mg quercetina/g de planta. En el mismo estudio, el resultado de fenoles totales fue mayor a 100 mg ácido gálico/g extracto seco casi cuatro veces más a nuestro extracto hidroalcohólico de 75 % con 24,89 mg ácido gálico/g planta. Otros estudios de flavonoides realizados a extractos metanólicos de hojas de *Buddleja saligna*⁹ determinaron 1,61 mg de quercetina/g de planta seca comparado con el valor obtenido de los extractos estudiados entre 118,52 a 369,24 mg de quercetina/g planta. Un estudio realizado solo a extractos etanólicos de la *Buddleja inkana*¹⁸ de dos diferentes lugares de Ecuador reportó para fenoles totales valores entre 27,47- 47,40 mg de ácido gálico/g de extracto, comparados a los obtenidos entre 82,29 - 172,58 mg de ácido gálico/g de extracto.

CONCLUSIONES

Los extractos hidroalcohólicos al 75 % (v/v) de etanol de las hojas de *Oreocallis grandiflora* y de la *Buddleja inkana*, O 75 y B 75, respectivamente; presentaron la mayor actividad antioxidante con los tres ensayos: FRAP, DPPH y ABTS^{•+}. Para el extracto O 75 se obtuvo actividad antioxidante en FRAP de 1317,53 mg Trolox/g planta, en DPPH un valor de IC₅₀ igual a 25,26 y en ABTS^{•+} un valor de IC₅₀ igual a 4,69 µg/mL y para el extracto B 75 se obtuvo actividad antioxidante en FRAP de 1997,78 mg Trolox/g de planta, en DPPH un valor de IC₅₀ igual a 62,39 µg/mL y en ABTS^{•+} un valor de IC₅₀ igual a 6,54 µg/mL.

El extracto hidroalcohólico O 75 presentó la mayor actividad antioxidante. El comportamiento antioxidante guardó relación con el contenido de compuestos fenólicos lo cual se evidenció a través de la cuantificación de metabolitos secundarios: flavonoides y fenoles totales.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el apoyo al CONCYTEC-FONDECYT por el financiamiento del proyecto 155-2017- FONDECYT, así como la colaboración del Dr. Mario Simirgiotis y la Ing. Milena Ríos, del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Austral de Chile y del Dr. Carlos Areche, del Laboratorio de Química de Compuesto Naturales Extremos de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García J, Laos D, Vega N, Bendejú M, Yarasca P, Guillermo J, *et al.* Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de las partes aéreas de *Solanum radicans* L.F. “huallpachaqui”. *Rev Soc Quim Perú.* 2020; 86(1): 5-12.
2. Castañeda B, Ramos E, Ibañez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horiz Med (Lima).* 2008; 8(1): 56-72.
3. Alam M, Juraimi A, Rafii M, Abdul-Hamid A, Aslani F, Hasan M, *et al.* Evaluation of antioxidant compounds, antioxidant activities, and mineral composition of 13 collected purslane (*Portulaca oleracea* L.) Accessions. *Biomed Res Int.* 2014;2014:296063. doi: 10.1155/2014/296063.
4. Lee JH, Lee SJ, Park S, Kim HK, Jeong WY, Choi JY, *et al.* Characterisation of flavonoids in *Orostachys japonicus* A. Berger using HPLC-MS/MS: Contribution to the overall antioxidant effect. *Food Chem.* 2011; 124(4): 1627-1633.
5. Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik S, Bektaşoğlu B. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidan Capacity Assay to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules.* 2007; 12: 1496-1547.
6. Ordóñez E, López A, Reátegui D. Infusiones de plantas medicinales: Actividad antioxidante y fenoles totales. *Agroind Sci.* 2020; 10(3): 259-266.
7. Lock O. Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988.
8. Morales G, Paredes A. Antioxidant activities of *Lampaya medicinalis* extracts and their main chemical constituents. *BMC Complement Altern Med.* 2014 Jul 21;14:259. doi: 10.1186/1472-6882-14-259.
9. Adedapo AA, Jimoh FO, Koduru S, Masika PJ, Afolayan AJ. Assessment of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Buddleja saligna*. *BMC Complement Altern Med.* 2009; 9:21. doi: 10.1186/1472-6882-9-21.
10. Twilley D, Moodley D, Rolfes H, Moodley I, McGaw LJ, Madikizela B, *et al.* Ethanolic extracts of South African plants, *Buddleja saligna* Willd and *Helichrysum odoratissimum* (L.) sweet, as multifunctional ingredients in sunscreen formulations. *S Afr J Bot.* 2021;137:171-182.
11. Backhouse N, Rosales L, Apablaza C, Goity L, Erazo S, Negrete R, *et al.* Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *J Ethnopharmacol.* 2008;116(2):263-269.

12. Pendota S, Ndhala A, Aremu A, Aderogba M, Van Staden J. Anti - inflammatory, antioxidant and *in silico* studies of *Buddleja salviifolia* (L). Lam leaf constituents. S Afr J Bot. 2014; 93: 79-85.
13. Alejandro M, Jaramillo X, Ojeda S, Malagon O, Ramirez J. Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur de Ecuador. Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromát. 2013; 12 (1): 59-68.
14. Sánchez M, Anicama N. Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico de hojas y flores de *Chuiraga spinosa* Less "huamanpinta" [Tesis]. Ica: Universidad San Luis Gonzaga de Ica; 2015.
15. Casado R, Landa A, Calvo J, García-Mina JM, Marston A, Hostettmann K, *et al.* Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal activity of *Chuquiraga spinosa*. Pharm Biol. 2011; 49(6):620-626.
16. Dobravalskytė D, Venskutonis PR, Talou T. Antioxidant properties and essential oil composition of *Calamintha grandiflora* L. Food Chem. 2012;135(3):1539-46.
17. Herrera O, Tinco J, Arroyo J, Franco C, Chumpitaz V, Castro W, *et al.* Antioxidant activity and cytotoxic profile of *Chuquiraga spinosa* Lessing on human tumor cell lines: A promissory plant from Peruvian flora. Asian Pac J Trop Dis. 2017; 7 (5): 304-308.
18. Llanga Guamán. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de Quishuar (*buddleja incana*), Aliso (*Alnus acuminata*) y Romerillo (*Hypericum laricifolium*) localizados en 3 zonas geográficas diferentes. [Tesis de grado]. Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2014. [Recuperado el 10 de marzo del 2021]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3427/1/56T00446.pdf>

ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS PARTES AÉREAS DE *Nasa ranunculifolia* (Kunth)

Arnold Jesús Pantoja Sánchez¹, Otilia Acha de la Cruz^{2†}, Ingrit Elida Collantes Díaz^{1,3*}

RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo investigar la influencia de la variación estacional sobre la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *Nasa ranunculifolia*, una planta efimera colectada en La Libertad (LLacuabamba) a una altura de 4052 msnm. Fueron identificados 36 compuestos de los cuales E- β -ionona, 2-Pentadecanona, fitol, n-octadecanol y los alcanos, n-tricosano, n-pentacosano, heptacosano y nonacosano son los que se mantienen presentes los cinco meses de colecta.

Palabras clave: Loasaceae, *Nasa ranunculifolia*, aceite esencial

STUDY OF THE VARIATION OF THE CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE ESSENTIAL OIL OF THE AERIAL PARTS FROM *Nasa ranunculifolia* (Kunth)

Abstract

The study present aims to investigate the influence of seasonal variation on chemical composition of the essential oil of the aerial parts of *Nasa ranunculifolia*, an ephemeral plant collected in La Libertad (LLacuabamba) at 4502 msnm. Thirty six compounds were identified, of which E- β -ionone, 2-Pentadecanone, phytol, n-octadecanol and the alkanes, n-tricosane, n-pentacosane, heptacosane and nonacosano are those are present the five months of collection.

Key words: Loasaceae, *Nasa ranunculifolia*, essential oil

INTRODUCCIÓN

La familia Loasaceae, en el Perú, está representada por 8 géneros y 112 especies, siendo la

¹ Pregrado, Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210 Rímac, Lima-Perú, ingrit_uni@hotmail.com

² Laboratorio LABICER de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería

³ Postgrado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería

mayoría de ellas herbáceas y presentan pelos urticantes. El género *Nasa* pertenece a esta familia y es muy rica en especies que son encontradas en la región mesoandina, puna húmeda y seca y bosques muy húmedos montanos, desde 1400 hasta 4700 msnm. *Nasa ranunculifolia* es un arbusto efímero (noviembre - abril) y puede ser encontrada desde el sur de Cajamarca hasta La Libertad¹, en la región norte del Perú es conocida bajo el nombre popular de ortiga colorada, ishanka de león y son usadas popularmente como antiinflamatorios², por entrevistas con los locales indican que el uso como antiinflamario es frotándose la zona afectada con las partes aéreas de *N. ranunculifolia*.

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles, su presencia y abundancia puede verse afectada por varios factores, incluyendo el tiempo en la recolección, el estrés abiótico y bióticos. El estrés abiótico se debe principalmente a factores físicos y químicos. Condiciones como altas temperaturas, sequía, frío, alto contenido de sal, metales pesados y daño mecánico. El estrés biótico se debe principalmente a varios factores biológicos como hongos, bacterias, virus, nemátodos y plantas parasitarias³.

El objetivo del presente trabajo es el estudio, en términos de rendimiento y composición química, del aceite esencial de las partes aéreas de *Nasa ranunculifolia* colectadas durante cinco meses consecutivos en La Libertad (Llacuabamba). El aceite esencial fue analizado por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas y fueron identificados 36 componentes, de los cuales ocho compuestos están presentes en todos los meses colectados, E- β -ionona (norisopropanoide), 2-Pentadecanona (cetona alifática), fitol (diterpeno oxigenado), n-octadecanol (alcohol alifático) y cuatro alcanos, n-tricosano, n-pentacosano, heptacosano y nonacosano.

PARTE EXPERIMENTAL

Las partes aéreas de *Nasa ranunculifolia* (figura 1) fueron colectadas en La Libertad (Llacuabamba) a una altura de 4052 msnm (S 08°03'37,29", W 077°26'21,3") durante 5 meses consecutivos, desde noviembre del 2019 hasta marzo del 2020. La identificación botánica fue realizada por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988) y fue clasificada como: perteneciente a la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, subclase Dilleniidae, orden Violales, familia Loasaceae, género *Nasa* y especie *Nasa ranunculifolia* (Kunth) (figura 1).

Las masas de las partes aéreas colectadas en los meses de noviembre 2019, diciembre 2019, enero, febrero y marzo del 2020 fueron de 849,4 g, 874 g, 139 g, 303,1 g, 925 g, respectivamente. No se pudo colectar el mes de abril del 2020 debido a la cuarentena por la pandemia de la COVID 19.

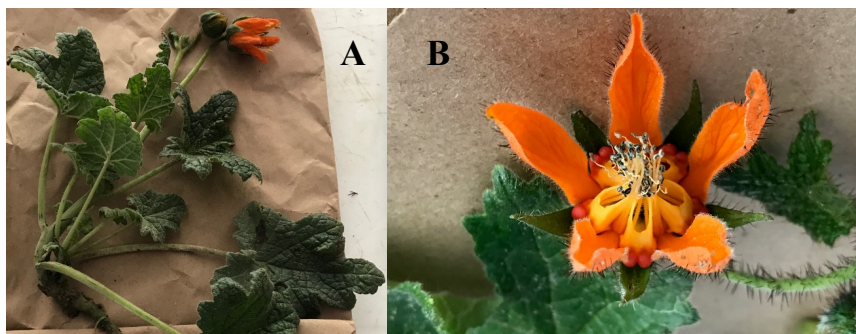


Figura 1. A: partes aéreas de *Nasa ranunculifolia*. B: flor de *N. ranunculifolia* (colectada en el mes de marzo del 2020).

Extracción de los aceites esenciales

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

Análisis de los aceites esenciales

Las muestras del aceite esencial fueron preparadas a una concentración de 1 mg/mL. El análisis por cromatografía gaseosa fue realizado en un cromatógrafo a gas acoplado a un espectrómetro de masas (Shimadzu, modelo CGMS-QP2010 Ultra) con las siguientes condiciones de análisis: columna capilar Restek Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); temperatura del inyector 260 °C, temperatura del detector 280 °C; impacto de electrones a 70 eV, con gas de arrastre helio a un flujo de 1,48 mL/min, con split 1/5; con un programa de temperatura de 80 °C (5') - 280 °C (5'), 8 °C/minuto; y con volumen de inyección de 3 µL. La identificación de la composición química fue basada por la comparación de los espectros de masas con el banco de datos del sistema de CG-EM de NIST 14 lib y por análisis de sus espectros⁵.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aceite esencial obtenido a través de hidrodestilación de las partes aéreas de *N. ranunculifolia* fue transparente, el rendimiento de cada mes fue variado, como se observa en la tabla 1; los meses de diciembre y enero presentaron bajo rendimiento respecto a los otros meses debido a que las muestras estaban húmedas.

Fueron identificados un total de 36 compuestos en el aceite esencial (tabla 1), distribuidos en las siguientes categorías: Alcohol (1, 6, 7, 8, 27, 29) alcanos alifáticos (9, 30, 31, 32,

33, 34, 35, 36) aldehídos (**2, 5, 10, 11, 13, 17**), ésteres (**3**) alquenos (**4**), cetonas (**23, 26**), hidrocarburo monoterpénico (**12, 14, 15, 16**) monoterpenos oxigenados (**18, 19, 20, 21, 22**), norisoprenoide (**24**), sesquiterpenos oxigenados (**25**), diterpenos oxigenados (**28**).

De los 36 compuestos identificados, los primeros 23 compuestos no son constantes en todos los meses, como el acetato de butilo (**3**), está en bajos porcentajes (0,19 %, 0,39 % y 0,26 %) en los meses de noviembre, febrero y marzo, este compuesto es ampliamente utilizado como materia prima para lacas, tintas, adhesivos, colorantes, solventes de pinturas y en la industria cosmética⁶; 2-hexenal (**5**) es comúnmente encontrada como componente volátil de plantas y se caracteriza porque es responsable del olor a hojas verdes y contribuye con la protección de la invasión de hongos e insectos⁷, este aldehído está presente en los meses de febrero (0,7 %) y marzo (16,6 %); el monoterpeno oxigenado linalool (**18**) que confiere aroma floral amaderado cítrico está presente, solamente, en los meses de diciembre, febrero y marzo en las proporciones de 3,09 %, 1,94 % y 3,34 % respectivamente, este monoterpeno es comúnmente encontrado en el aceite esencial de muchas plantas y presenta actividad antibacteriana, antiplasmódica, antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, también es considerado como un atractivo para un amplio espectro de polinizadores (abejas, mariposas, etc.) y tiene efecto sobre el sistema nervioso central⁸.

Es a partir de los 46 minutos del cromatograma que se presentan compuestos constantes todos los meses como β -ionona, la cetona 2-Pentadecanona, el diterpeno oxigenado fitol, el alcohol alifático n-Octadecanol y los alcanos n-Tricosano, n-Pentacosano, heptacosano y nonacosano, como se presenta en la figura 2.

La β -ionona es un norisopropanoide cuya biosíntesis es a través del ácido mevalónico que se encuentra ampliamente distribuido en flores, hojas, cortezas, frutos y raíces de plantas y es comúnmente producido a bajos porcentajes en plantas⁹, este norisopropanoide es ampliamente obtenido como la fragancia de las violetas y es ampliamente usado en la industria de los aromas, incluyendo cosméticos y no-cosméticos¹⁰. En el presente estudio, fue identificado y está en bajos porcentajes (1,12 %, 2,61 %, 1,8 %, 1,15 % y 1,25 %) durante los meses de colecta como afirma Paparella *et al* 2021. Presenta una amplia variedad de efectos farmacológicos como anticancerígeno, quimiopreventivo, antioxidante, antiinflamatorio y antimicrobial¹⁰, regulador del crecimiento y de defensa de las plantas que producen⁹.

El diterpeno oxigenado fitol se encuentra como parte de la molécula de la clorofila y es producido por casi todos los organismos fotosintéticos como algas, plantas y algunas bacterias, es usado como constituyente de fragancias ya que es encontrado también en los aceites esenciales de algunas plantas¹¹. En el aceite esencial de las partes aéreas de *N. ranunculifolia* está en las proporciones de 18,28 %, 23,1 %, 4,09 %, 6,01 % y 5,2 %, respectivamente, en cada mes de colecta; las muestras colectadas en los meses de noviembre y diciembre sólo presentaban hojas, a partir de la colecta de enero comenzó a aparecer las flores en botones, es probable que la presencia sólo de hojas en *N. ranunculifolia* es la razón por lo que los niveles de fitol sean altos (18,28 % y 23,1 %) sólo en estos dos meses. El fitol presenta actividad ansiolítica, citotóxica, antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobial¹¹.

El alcohol alifático 1-octadecanol está presente los 5 meses de colecta, este alcohol es utilizado en la producción de emulsiones, aceites textiles, antiespumante y lubricantes¹².

Los alcanos n-Tricosano, n-Pentacosano, heptacosano y nonacosano son de cadena larga con número de carbonos impares, son los que están presentes en todos los meses de colecta. En la figura 2 se puede observar, en los meses de noviembre, diciembre, enero y marzo, la variación (%) de los alcanos n-Tricosano, n-Pentacosano, heptacosano, mes a mes van de manera creciente, alcanzando siempre el máximo valor heptacosano; en estos mismos meses de colecta el nonacosano se mantiene prácticamente constante.

En el mes de febrero, se presentó una variación diferente ya que en este mes las proporciones van del n-Tricosano>n-Pentacosano>heptacosano>nonacosano (13,57 %, 12,59 %, 7,68 % y 2,42 %, respectivamente). Es en este mes que se presentan, solamente, los monoterpenos cis-Mirtanol y trans-Mirtanol en altos porcentajes 8,18 % y 13,27 %, respectivamente, ambos monoterpenos presentan actividad repelente contra los piojos¹³, también es reportado que el cis-Mirtanol presenta efecto sedante equivalente al pentobarbital¹⁴.

Tabla 1. Porcentajes de rendimiento de los aceites esenciales de las partes aéreas de *N. ranunculifolia* colectados durante los meses de noviembre y diciembre del 2020 y enero, febrero y marzo del 2021; así como los componentes identificados, tiempo de retención.

N°	Porcentaje de rendimiento (w/w %)	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar
		0,0034	0,0028	0,0023	0,0036	0,0034
	Nombre	TR				
1	2Z-Pentenol	3,568	-	-	-	0,36
2	Hexanal	4,187	-	-	-	1,59
3	Acetato de butilo	4,635	0,19	-	0,39	0,26
4	2E-Octene	5,599	-	-	-	0,57
5	2E-Hexenal	5,772	-	-	0,7	16,6
6	3Z-Hexenal	5,953	-	-	-	5,33
7	2Z-Hexenal	6,322	-	-	0,55	1,27
8	n-Hexenal	6,481	-	-	-	1,32
9	n-Nonano	7,727	-	-	-	0,61
10	Heptanal	7,848	-	-	-	0,61
11	Benzaldehído	10,826	-	-	-	1,54
12	α -Felandreno	13,371	-	-	-	1,22
13	2E,4E-Heptadienal	13,877	-	-	-	1,69
14	<i>p</i> -Cimeno	14,658	-	-	-	1,01
15	Silvestreno	14,903	-	-	-	1,58
16	Z- β -Ocimeno	15,691	-	-	-	0,73
17	Fenilacetaldehído	15,937	-	-	-	0,94
18	Linalool	20,282	-	3,09	-	1,94
19	Nopinona	21,834	-	-	0,8	-
20	<i>trans</i> -Vervanol	23,173	0,4	-	-	-
21	<i>cis</i> -Mirtanol	29,747	-	-	8,18	-
22	<i>trans</i> -Mirtanol	30,212	-	-	13,27	-
23	3-Dodecanona	43,391	-	-	1,57	-
24	β -ionona	46,031	1,12	2,61	1,8	1,15
25	Espatuleno	50,805	0,42	-	-	-
26	2-Pentadecanona	65,804	2,2	2,8	0,72	2,46
27	n-Hexadecanol	79,044	-	-	9,8	-
28	Fitol	80,363	18,28	23,1	4,09	6,01
29	n-Octadecanol	85,955	3,01	10,16	5,75	4,54
30	n-Tricosano	86,455	4,78	1,35	6,69	13,57
31	Tetracosano	89,525	0,6	-	-	1,36
32	n-Pentacosano	94,389	15,4	7,41	9,64	12,59
33	n-Hexacosano	97,651	0,36	-	-	-
34	Heptacosano	101,75	25,21	22,41	27,75	7,68
35	Octacosano	104,43	0,56	-	-	1,28
36	Nonacosano	108,62	12,98	12,98	12,68	2,42
	Alcohol alifático	3,01	-	15,55	0,55	9,43
	Alcano alifático	59,89	44,15	56,76	37,62	43,30
	Aldehído	-	-	-	0,7	22,03
	Ésteres	0,19	-	-	0,39	0,26
	Alquenos	-	-	-	-	0,57
	Cetonas	2,2	2,8	0,72	4,03	1,17
	Hidrocarburo Monoterpénico	-	-	-	-	4,54
	Monoterpenos oxigenados	0,4	3,09	-	24,19	3,34
	Norisoprenoide	1,12	2,61	1,8	1,15	1,25
	Sesquiterpeno oxigenado	0,42	-	-	-	-
	Diterpeno oxigenado	18,28	23,1	4,09	6,01	5,2
	Total de compuestos identificados (%)	85,51	75,75	78,92	74,64	91,09

TR: tiempo de retención, **Nov:** noviembre, **Dic:** diciembre, **Ene:** enero, **Feb:** febrero, **Mar:** marzo

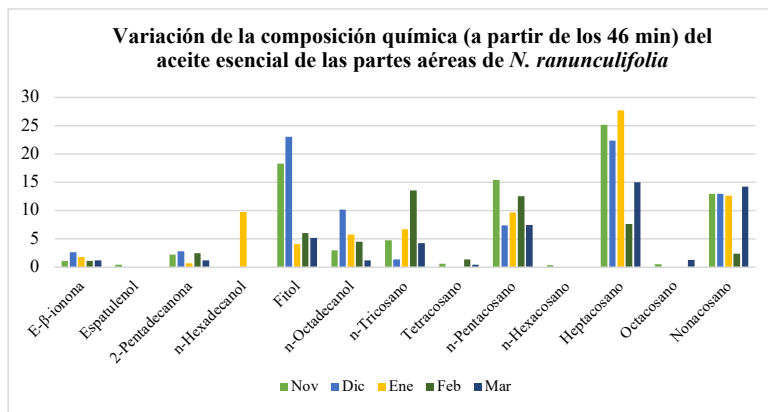


Figura 2. Variación estacional de la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *N. ranunculifolia* a partir de los 46 min.

CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se reporta, por primera vez, el estudio de la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *N. ranunculifolia* colectado por 5 meses consecutivos, en el que se observó que los 4 primeros meses la composición del aceite esencial no presenta hidrocarburos monoterpénicos, mientras que los monoterpénos oxigenados sólo no están presentes el mes de enero. Los compuestos observados constantemente presentes en todas las colectas fueron el norisoprenoide β-ionona, la cetona 2-Pentadecanona, el diterpeno oxigenado fitol, el alcohol n-Octadecano y los alcanos n-tricosano, n-Pentacosano, heptacosano y nonacosano.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al financiamiento del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería, Proyecto de Investigación Formativa FIQT-FI-31-2020.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rodríguez E, Weigend M. Loasaceae endémicas del Perú. *Rev Peru Biol.* 2006; 13(2): 391s-402s.
- Rodríguez EFR, Izquierdo EA, Velásquez LP, Rodríguez EH, Cayatopa VR, Gallac SM, Pizarro YP. Estado actual de la flora con pelos urticantes en la región La Libertad, Perú. *Sagasteguiana.* 2014; 2(2): 113-134.

3. Wang X, Li N, Li W, Gao X, Cha M, Qin L, Liu L. Advances in Transcriptomics in the Response to Stress in Plants. *Glob Med Genet.* 2020;7(2):30-34.
4. Oliveira TS, Bombo AB, Oliveira AS, Garcia VL, Appezzato-DA-Glória B. Seasonal variation of the essential oil from two Brazilian native *Aldama* La Llave (Asteraceae) species. *An Acad Bras Cienc.* 2016;88(3 Suppl):1899-1907.
5. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Ed. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation; 2007.
6. Londoños AO, Lenis FL, Mendivelso LAB, Niño GR, Suárez LMC. Estudio de la síntesis de acetato de butilo y análisis de las condiciones de equilibrio. *Ing. Investig.* 2005; 25(3): 13-21.
7. Kunishima M, Yamauchi Y, Mizutani M, Kuse M, Takikawa H, Sugimoto Y. Identification of (Z)-3: (E)-2-Hexenal isomerases essential to the production of the leaf aldehyde in plants. *J Biol Chem.* 2016; 291(27): 14023-14033.
8. Kamatou GPP, Viljoen AM. Linalool - A review of a biologically active compound of commercial importance. *Nat Prod Commun.* 2008; 3(7): 1183-1192.
9. Paparella A, Shaltiel-Harpaza L, Ibdah M. β -ionone: Its occurrence and biological function and metabolic engineering. *Plants.* 2021; 10(4):754. doi:10.3390/plants10040754.
10. Aloum L, Alefishat E, Adem A, Petroianu G. Ionone is more than a Violet's fragrance: A Review. *Molecules.* 2020; 25(24):5822. doi.org/10.3390/molecules25245822.
11. Islam MT, Ali ES, Uddin ShJ, Ahmed MI, Shill MCh, Karmakar UK, et al. Phytol: A review of biomedical activities. *Food Chem Toxicol.* 2018;121:82-94.
12. The Merck Index, 12th ed. Boca Ratón, FL: CRC Press; 1996. Entry # 8960.
13. Miyazawa M, Suzuki Y, Kameoka H. Biotransformation of (-)-*cis*-Myrtenol and (+)-*trans*-Myrtenol by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulate*. *Phytochem.* 1997; 45(5): 935-943.
14. De Sousa DP, Raphael E, Brocksom U, Brocksom TJ. Sedative effect of monoterpene alcohols in mice: a preliminary screening. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2007;62(7-8):563-6.

ENSAYOS PRELIMINARES PARA PRODUCCIÓN DE CELULOSA POR BACTERIAS AISLADAS DE CAÑA DE AZÚCAR

Jonathan Tuya Salas*, Susana Gutiérrez Moreno^a, Fernando Merino Rafael^a

RESUMEN

La celulosa bacteriana tiene una variedad de aplicaciones tanto en las industrias del papel, textil, alimentaria, cosmética y la medicina; esto se debe a sus excelentes propiedades fisicoquímicas tales como: alto grado de pureza, alta cristalinidad, excelente biodegradabilidad, un alto módulo de Young, una gran capacidad de retención de agua y una excelente afinidad biológica. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la producción de celulosa por bacterias aisladas de caña de azúcar. Las muestras recolectadas se dejaron fermentar hasta la aparición de una película gruesa en la superficie, a partir de la cual se obtuvieron cultivos axénicos sobre el medio HS. Los cultivos aislados se transfirieron a caldo HS y se incubaron en condiciones estáticas hasta la formación de una película en la superficie del cultivo. La identificación bacteriana se realizó en base a una caracterización fisiológica de las cepas aisladas y su capacidad de producir celulosa. El análisis de FT-IR de la película mostró un espectro correspondiente a los grupos funcionales característicos de la celulosa bacteriana y vegetal. La cepa BCP-3,5 identificada como *Komagataeibacter* sp. fue capaz de producir celulosa bacteriana en condiciones estáticas de cultivo.

Palabras clave: Celulosa, azúcar de caña, bacteria, biopolímero, *Komagataeibacter* sp.

PRELIMINARY TEST FOR CELLULOSE PRODUCTION BY BACTERIA ISOLATED FROM SUGARCANE

ABSTRACT

Bacterial cellulose has a variety of applications both in the paper, textile, food, cosmetic and medicine industries; This is due to its excellent physicochemical properties such as: high degree of purity, high crystallinity, excellent biodegradability, high Young's modulus, high water retention capacity and excellent biological affinity. The objective of this work was to evaluate cellulose production by bacteria isolated from sugarcane. The collected samples were allowed to ferment until the appearance of a thick film on the surface, from which axenic

*¹Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Ciudad Universitaria, Av. Venezuela Cdra. 34 s/n Lima - Perú. email: jondavtusa@gmail.com

cultures were obtained on the HS medium. Isolated cultures were transferred to HS broth and incubated under static conditions until a film formed on the culture surface. Bacterial identification was carried out based on a physiological characterization of the isolated strains and their capacity to produce cellulose. FT-IR analysis of the film showed a spectrum corresponding to the characteristic functional groups of bacterial and plant cellulose. The BCP-3,5 strain identified as *Komagataeibacter* sp. was able to produce bacterial cellulose under static culture conditions.

Key words: Cellulose, sugarcane, bacteria, biopolymer, *Komagataeibacter* sp.

INTRODUCCIÓN

La celulosa es uno de los biopolímeros más abundantes sobre la Tierra, es producido principalmente por las plantas como componente principal de su pared celular¹. La celulosa es una materia prima que tiene múltiples propósitos: es material de construcción, generación de fibras textiles y fabricación de papel, además, sus derivados (ésteres, acetatos, nitratos) están implicados en diversos procesos industriales. Sin embargo, hay algunas especies de bacterias, como las de los géneros *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Komagataeibacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Dickeya* y *Rhodobacter*, que también pueden producir celulosa de forma extracelular². La fórmula molecular de la celulosa bacteriana es la misma que la de la celulosa vegetal, pero sus características físicas y químicas son diferentes³. El principal género microbiano productor y modelo de síntesis de celulosa es *Komagataeibacter* (antes *Gluconacetobacter*), perteneciente a la familia *Acetobacteraceae*, que son bacilos Gram negativos, aerobios obligados. Estas bacterias pueden aislarse de la superficie de muchas flores y frutos, entre ellos la caña de azúcar, además de bebidas fermentadas^{4,5,6}. La producción de celulosa por *Komagataeibacter*, responde a necesidades fisiológicas. Las bacterias se adhieren al biopolímero para aumentar su exposición al oxígeno y para tomar los nutrientes contenidos en los líquidos absorbidos del ambiente, además los protege contra la radiación ultravioleta. En cultivos estáticos, la formación de celulosa se observa como una película en la interfase aire-líquido. En cultivos agitados la celulosa se agrupa en gránulos irregulares, también se observa la aparición espontánea de mutantes no productores de celulosa, esto crea inconvenientes para la producción en masa de este biopolímero^{7,8,9}. La celulosa presenta características únicas: i) alto grado de pureza, ya que no contiene hemicelulosa ni lignina como si ocurre en la celulosa de origen vegetal; ii) alta cristalinidad; iii) excelente biodegradabilidad; iv) un alto módulo de Young (15~30 GPa), uno de los más alto de todos los materiales orgánicos; v) una gran capacidad de retención de agua, hasta cien veces su peso y vi) una excelente afinidad biológica^{10,11}. Debido a las propiedades únicas, la celulosa ha encontrado una variedad de aplicaciones tanto en las industrias del papel, textil, alimentaria y como un biomaterial muy útil en la industria cosmética y la medicina^{11,12}. Este trabajo tuvo como objetivo aislar bacterias de caña de azúcar capaces de producir de celulosa en condiciones de laboratorio.

PARTE EXPERIMENTAL

Recolección de muestras y procesamiento

Un total de 5 muestras de cañas de azúcar fueron colectadas del mercado mayorista N° 1. Cada una de las muestras fueron lavadas superficialmente con agua destilada estéril, se tomaron aproximadamente 20 mL del agua de lavado y se depositaron en una botella de 500 ml conteniendo 300 mL de su propio extracto de caña. Las botellas fueron cubiertas con una gasa estéril y se dejaron incubar a temperatura ambiente por 25 días hasta la formación de una película en la superficie del extracto de caña.

Condiciones de crecimiento y aislamiento

En condiciones estériles, se tomó con el asa de siembra una alícuota de la superficie de la película y se sembró por agotamiento sobre el medio Hestrin-Schramm (HS)¹³. El medio contenía: 20,0 g/L de glucosa; 5,0 g/L de extracto de levadura; 5,0 g/L de peptona; 2,7 g/L de Na₂HPO₄; 5,7 g/L de MgSO₄·7H₂O; 1,15 g/L de ácido cítrico; pH final de 5,7. El medio se autoclavó a 121 °C por 15 min. Las colonias, seleccionadas preliminarmente, fueron catalogadas y transferidas a un nuevo caldo HS e incubadas por 2 días a 30 °C. Se aislaron colonias microbianas a partir de cada cultivo que presentó la formación de una película superficial. Este procedimiento se repitió hasta la obtención de cultivos puros. Finalmente se transfirió 0,1 ml de un cultivo puro (incubado por 2 días a 30 °C) sobre 200 ml de caldo HS y se incubó por 6 días a 30 °C, hasta la formación de una película superficial gruesa.

Recuperación y caracterización de la película por FT-IR

La película fue retirada del cultivo y lavada con agua del grifo, 200 ml de NaOH al 2 % (w/v) a 80 °C por 20 min y 200 ml de ácido acético al 2 % (v/v), este tratamiento se repitió tres veces; finalmente, la película fue lavada con agua destilada estéril. Luego de ese tratamiento, la película fue secada a 80 °C en una estufa durante 2 horas^{14,15}. La caracterización química de la película se realizó mediante espectroscopia infrarroja, FT-IR (Modelo IMPACT 410, NICOLET), a una longitud de onda entre el rango de 4000 a 400 cm⁻¹.

Identificación de las cepas aisladas

Se realizó siguiendo la metodología propuesta por Kersters *et al.*¹⁶ y Komagata *et al.*¹⁷. La identificación consistió en la realización de las siguientes pruebas: coloración Gram, catalasa, oxidación de etanol a ácido acético, oxidación de ácido acético a CO₂ y H₂O, oxidación de lactato a CO₂ y H₂O, crecimiento sobre 3 % etanol (v/v) en presencia de 5 % de ácido acético, requerimiento de ácido acético para crecer, crecimiento en presencia de 30 % de D-glucosa, formación de ácido glucónico y la producción de celulosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se lograron aislar, inicialmente, 7 cepas a partir de las muestras de caña de azúcar, de las cuales solo la cepa catalogada como CBP-3,5 mostró mayor producción de una película en la superficie del medio de cultivo HS después de los dos días de incubación. De acuerdo a otros

estudios, la formación de celulosa en cultivos estáticos comienza generalmente después de 2 días de incubación; sin embargo, esto puede variar dependiendo de la cepa y las condiciones de cultivo^{3,18}. Las colonias aisladas mostraron las siguientes características morfológicas: colonias cremas-blancas, secas, lisas, convexas, con un diámetro de entre 2 a 3 mm (figura 1A). Estas características morfológicas de las colonias sobre el medio HS fueron también reportadas en otras investigaciones^{3,19,20}. La formación de una película superficial gruesa se observó luego del sexto día de incubación (figura 1B).

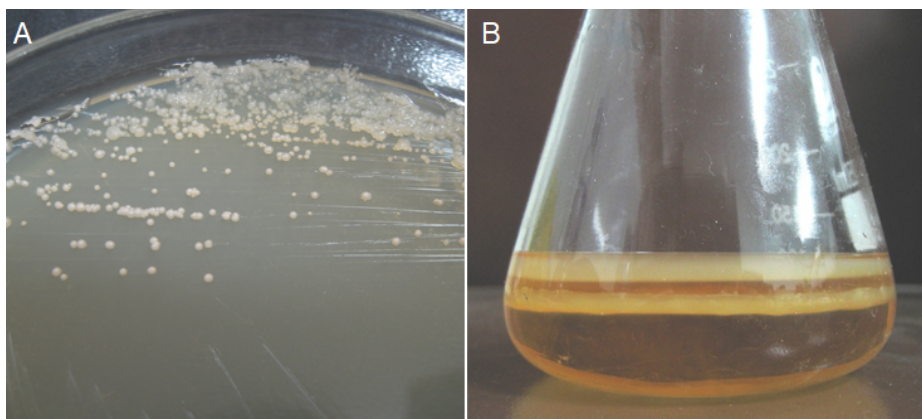


Figura 1. A: Colonias aisladas de caña de azúcar pertenecientes a la cepa CBP-3,5.
B: Formación de una película superficial producida por la cepa CBP-3,5 en cultivo estático sobre el medio HS durante 6 días de incubación a 30 °C.

Luego de recuperar la película del cultivo estático (figura 2A), se realizó un lavado con agua de la película y un tratamiento con NaOH al 2 % a 80 °C. Este tratamiento es útil para eliminar las células bacterianas adheridas a la película y restos del medio de cultivo empleado^{14,21}, sin llegar a hidrolizar la celulosa ni formar celulosa alcalina; además, mejora la porosidad y la elasticidad de la celulosa^{22,23}. La celulosa bacteriana es estable en soluciones básicas, pero es susceptible a hidrólisis alcalina en condiciones drásticas. Concentraciones elevadas de álcali y temperaturas iguales o superiores a 100 °C pueden provocar la hidrólisis de la celulosa o formar celulosa alcalina, forma modificada de la celulosa^{24,25}. Por otro lado, el tratamiento con ácido acético al 2 % permite neutralizar el efecto del tratamiento con el álcali¹⁵. Luego del tratamiento con el NaOH y el ácido acético la película se vuelve traslúcida y pierde volumen debido al tratamiento de secado en horno (figura 2B). El tratamiento con calor permite secar la película para realizar el análisis por FT-IR sin afectar su cristalinidad. Aunque la celulosa bacteriana puede calentarse hasta 325 °C antes de comenzar a quemarse¹¹, se ha encontrado que a temperaturas de secado cercanas a los 50 °C puede llegar a afectar algunas de sus propiedades y sus posibles aplicaciones²⁰. También se han reportado que estas temperaturas pueden producir polimorfismos de la celulosa, lo que fue se evidencia cuando se analizan los picos de absorción en los resultados de FT-IR²⁶.

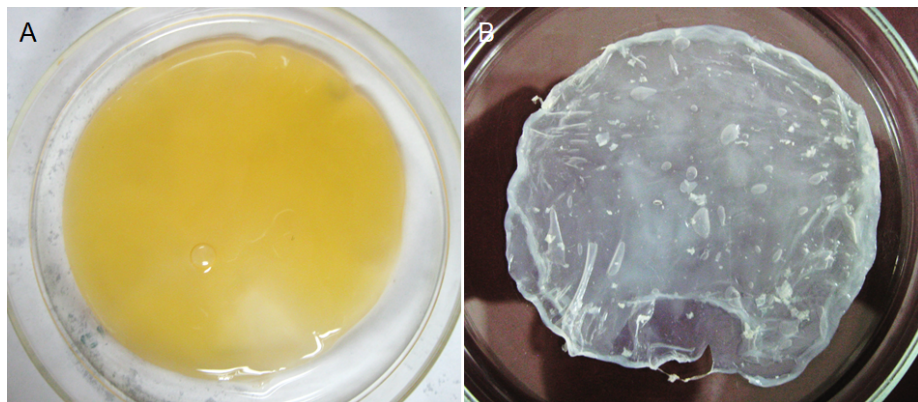


Figura 2. Película producida en cultivo estático por la cepa CBP-3,5. **A:** Antes del tratamiento con NaOH y ácido acético. **B:** Después del tratamiento y secado.

El análisis de FT-IR se utilizó para determinar los picos de absorción correspondientes a las vibraciones de enlaces en los grupos funcionales encontrados en la película¹¹.

En la figura 3 se observa un pico a $3349,09\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a las vibraciones de tensión del grupo OH, vibraciones de tensión de los grupos CH y CH₂ a $2918,27\text{ cm}^{-1}$, vibraciones de flexión del grupo OH a $1638,44\text{ cm}^{-1}$ debido a la retención de agua por la muestra, vibraciones de tensión del grupo COO a $1560,40\text{ cm}^{-1}$, vibraciones de tensión simétricas de los grupos CH₂ o en el grupo OH a $1421,19\text{ cm}^{-1}$, vibraciones de flexión simétricas del grupo OH a $1204,43\text{ cm}^{-1}$, vibraciones de tensión del grupo C-O-C a $1159,28\text{ cm}^{-1}$, vibraciones de tensión del grupo C-O y C-O-C a $1111,62\text{ cm}^{-1}$ y un pico a $1059,65\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a las vibraciones de tensión del grupo C-O. El espectro y las vibraciones de los grupos son similares a otras celulosas de origen bacteriano y vegetal encontradas en otros estudios, esto indicaría que la película producida por la cepa CBP-3,5 se trataría de un biopolímero de celulosa^{20,24,25}.

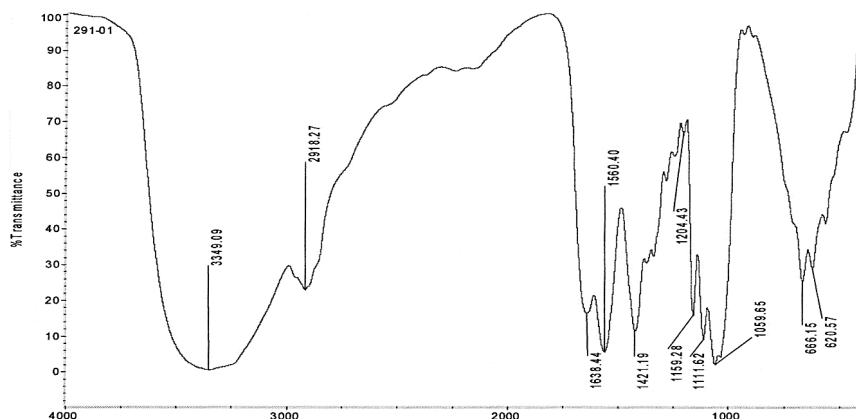


Figura 3. Análisis químico mediante FT-IR de la película producida por la cepa BCP-3,5.

La metodología propuesta de Komagata *et al.* y Kersters *et al.* permite identificar las características fisiológicas y bioquímicas específicas del género *Komagataeibacter*, incluyendo a las especies capaces de producir celulosa^{16,17}. Los resultados de las características fisiológicas y bioquímicas evaluadas para la identificación de la cepa CBP-3,5 se resumen en la tabla 1. Los resultados de la identificación mostraron que la cepa CBP-3,5 corresponde a la bacteria *Komagataeibacter* sp. Estos resultados son consistentes a los encontrados en otros estudios donde también utilizaron características fisiológicas para la identificación de esta especie bacteriana^{15,27}.

Tabla 1. Resultados de la identificación de la cepa CBP-3,5.

Características fisiológicas	Cepa CBP-3,5	<i>Komagataeibacter</i> sp. ^{16,17}
Coloración Gram	Bacilos Gram negativos	Bacilos Gram negativos
Catalasa	+	+
Oxidación de etanol a ácido acético	+	+
Oxidación de ácido acético a CO ₂ y H ₂ O	+	+
Oxidación de lactato a CO ₂ y H ₂ O	+	+
Requerimiento de ácido acético para crecer	-	-
Crecimiento en 3 % etanol (v/v) en presencia de 5 % de ácido acético	-	-
Crecimiento en 30 % de D-glucosa	-	-
Formación de ácido glucónico de D-glucosa	+	+
Producción de celulosa	+	+

CONCLUSIONES

En este estudio se lograron aislar 7 cepas a partir de las 5 muestras de caña de azúcar, de estas cepas solo la cepa CBP-3,5 fue capaz de producir una película superficial en condiciones estáticas de incubación. La cepa BCP-3,5 fue identificada en base a sus características fisiológicas como *Komagataeibacter* sp. El análisis de FT-IR de la película producida por la cepa BCP 3,5 mostró que este biopolímero tiene un espectro similar a la celulosa de origen bacteriano y vegetal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen de gran manera al Decano de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM y María Angélica Rodríguez Best, directora de la Unidad de Análisis Químicos (USAQ), por los servicios y facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Vandamme EJ, De Baets S, Vanaelen A, Joris K, De Wulf P. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polym Degrad Stab.* 1998;59(1-3):93-99.
2. Lin S-P, Loira Calvar I, Catchmark JM, Liu J-R, Demirci A, Cheng K-C. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose.* 2013;20(5):2191-2219.
3. Campano C, Balea A, Blanco A, Negro C. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. *Cellulose.* 2016;23(1):57-91.
4. Yamada Y, Hosono R, Lisdyanti P, Widyastuti Y, Saono S, Uchimura T, et al. Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *J Gen Appl Microbiol.* 1999;45(1):23-28.
5. Williams WS, Cannon RE. Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum*. *Appl Environ Microbiol.* 1989;55(10):2448-2452.
6. Yamada Y, Yukphan P, Lan Vu HT, Muramatsu Y, Ochaikul D, Tanasupawat S, et al. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). *J Gen Appl Microbiol.* 2012;58(5):397-404.
7. Wang J, Tavakoli J, Tang Y. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods - A review. *Carbohydr Polym.* 2019;219: 63-76.
8. Valla S, Kjosbakken J. Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*. *Microbiology.* 1982;128(7):1401-1408.
9. Byrom D. Microbial cellulose. En: Byrom D, editor. *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources.* London: Palgrave Macmillan UK; 1991. p. 263-283.
10. Shoda M., Sugano Y. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2005;10(1):1-8.

11. Pecoraro É, Manzani D, Messaddeq Y, Ribeiro SJL. Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications. En: Belgacem M, Gandini A, editors. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. Ámsterdam: Elsevier Science; 2007. p. 369-83.
12. Gorgieva S, Trček J. Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. *Nanomaterials (Basel)*. 2019;9(10):1352. doi: 10.3390/nano9101352.
13. Hestrin S, Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem J*. 1954;58(2):345-52.
14. Kurosumi A, Sasaki C, Yamashita Y, Nakamura Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydr Polym*. 2009;76(2):333-335.
15. Jahan F, Kumar V, Rawat G, Saxena RK. Production of microbial cellulose by a bacterium isolated from fruit. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;167(5):1157-71.
16. Kersters K, Lisdiyanti P, Komagata K, Swings J. The Family Acetobacteraceae: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. New York, NY: Springer New York; 2006. p. 163-200.
17. Komagata K, Iino T, Yamada Y. The Family Acetobacteraceae. En: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editores. The Prokaryotes. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 3-78.
18. Schramm M, Hestrin S. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *J Gen Microbiol*. 1954;11(1):123-9.
19. Wang Z-G, Xiang D, Wang X-B, Li C-F. Preparation of an inoculum of *Gluconacetobacter xylinus* without mutants in shaken culture. *J Appl Microbiol*. 2016;121(3):713-20.
20. Wang S-S, Han Y-H, Ye Y-X, Shi X-X, Xiang P, Chen D-L, et al. Physicochemical characterization of high-quality bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter* sp. strain W1 and identification of the associated genes in bacterial cellulose production. *RSC Adv*. 2017;7(71):45145-55.
21. Yamanaka S, Sugiyama J. Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose*. 2000;7(3):213-25.
22. Tang W, Jia S, Jia Y, Yang H. The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010;26(1):125-131.
23. Laborie M-PG. Bacterial cellulose and its polymeric nanocomposites. En: Lucia LA, Rojas O, editors. The Nanoscience and Technology of Renewable Biomaterials. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2009. p. 231-271.
24. General considerations on structure and reactivity of cellulose: Section 2.3-2.3.7. En: Klemm D, Philipp B, Heinze T, Heinze H, Wagenknecht W, editores. Comprehensive Cellulose Chemistry. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2004. p. 83-129.

25. Oh SY, Yoo DI, Shin Y, Seo G. FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. *Carbohydr Res.* 2005;340(3):417-428.
26. Vasconcellos VM, Farinas CS. The effect of the drying process on the properties of bacterial cellulose films from *Gluconacetobacter hansenii*. *Chem Eng Trans.* 2018; 64: 145-150.
27. Zhang W, Wang X, Qi X, Ren L, Qiang T. Isolation and identification of a bacterial cellulose synthesizing strain from kombucha in different conditions: *Gluconacetobacter xylinus* ZHCJ618. *Food Sci Biotechnol.* 2018;27(3):705-713.

NIVELES DE As, Cd, Cu, Mn, Se Y Zn EN TEJIDO MUSCULAR Y HEPÁTICO DEL *Cheilodactylus variegatus* VALENCIENNES, 1833 “PINTADILLA” EN LA ZONA COSTERA DE LIMA, PERÚ

Sigfredo Alexander Quintana Paetán*

RESUMEN

La “pintadilla” (*Cheilodactylus variegatus* Valenciennes, 1833) es una especie marina que se desarrolla cerca de la costa y es capturada por la pesca artesanal para consumo humano. El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de los elementos As, Cd, Cu, Mn, Se y Zn en esta especie (tejido muscular y tejido hepático) en la zona costera de Lima. Se recolectaron un total de 32 muestras, durante 8 meses (periodo de setiembre 2018 a marzo 2019), en los mercados pesqueros artesanales de Chorrillos y Ancón, determinándose la concentración de los elementos citados mediante la espectrofotometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). En general, las mayores concentraciones promedio de elementos fueron encontradas en el tejido hepático en comparación con el tejido muscular para ambas zonas (cadmio y manganeso no se detectaron en el tejido muscular). Se evidenció que no hay diferencia significativa entre las medias de las concentraciones para las dos zonas de muestreo (con excepción del cobre). Se evidenció correlación positiva solo en algunos de los elementos en estudio.

Palabras clave: Bioacumulación, espectrofotometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo, metales, no metales, pintadilla.

LEVELS OF AS, CD, CU, MN, SE AND ZN IN MUSCLE AND LIVER TISSUE OF CHEILODACTYLUS VARIEGATUS VALENCIENNES, 1833 “PINTADILLA” IN THE COASTAL AREA OF LIMA, PERU

ABSTRACT

The "pintadilla" (*Cheilodactylus variegatus* Valenciennes, 1833) is a marine species that grows near the coast and is caught by artisanal fishing for human consumption. The objective of this study was to determine the concentration of the elements As, Cd, Cu, Mn, Se and Zn in this species (muscle tissue and liver tissue) in the coastal zone of Lima. A total of 32

* Unidad de Posgrado. Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos UNMSM. Av. Venezuela s/n cuadra 34. Lima, Perú.
e-mail: alexander.quintana.paetan@gmail.com

samples were collected, during 8 months (period from september 2018 to march 2019), in the Artisanal Fisheries Markets of Chorrillos and Ancon, determining the concentration of the mentioned elements by means of optical emission spectrophotometry with inductively coupled plasma (ICP-OES). In general, the highest average concentrations of elements were found in liver tissue compared to muscle tissue for both areas (cadmium and manganese were not detected in muscle tissue). It was evidenced that there is no significant difference between the means of the concentrations for the two sampling areas (with the exception of copper). Positive correlation was evidenced only in some of the elements under study.

Keywords: Bioaccumulation, inductively coupled plasma optical emission spectrophotometry, metals, nonmetals, pintadilla.

INTRODUCCIÓN

Cheilodactylus variegatus Valenciennes, 1833; nombre científico de la “pintadilla” o “paramo”, conocidas con estos nombres en Perú¹, “bilagay” o “pintacha” en Chile², es una especie marina que se desarrolla entre Paita, Piura (Perú) y la Región de Los Lagos (Chile)^{2,3}. La pintadilla se desarrolla cerca de la costa, en zonas rocosas que pueden estar cubiertas de algas^{3,4}, es una especie bentónica que vive en pequeños cardúmenes, se desarrollan hasta profundidades de 40 metros³, cercanas a la costa, en aguas de color o turbias, de preferencia⁵. En el Perú, la extracción y pesca de la pintadilla se realiza dentro de las 5 millas marinas, con el empleo de arpones, redes cortina o atarrayas, anzuelo, entre otros, por pescadores artesanales⁵. La alimentación de esta especie está compuesta por una variedad de invertebrados marinos, mayormente por crustáceos y moluscos⁶, además de platelmintos, poliquetos y equinodermos entre otras especies^{3,5,6,7}.

El mar es una fuente de alimentos con alto contenido de proteínas (fauna marina); sin embargo, debido a los altos niveles de contaminación cada vez más crecientes, para algunos investigadores el mar se considera como el basurero sin fronteras que es el destino final de residuos, básicamente antropogénicos⁸. La mayor parte de la destrucción del hábitat marino se produce en la franja costera⁹, producto de la contaminación, lo que provoca modificaciones ecológicas susceptibles de amenazar el equilibrio natural⁸, siendo mayor esta problemática en los países en vías de desarrollo donde el crecimiento de la población, la pobreza y la falta de una gestión gubernamental adecuada agudizan esta situación⁹.

Entre los contaminantes químicos vertidos a los cuerpos de agua marinos tenemos a los metales. Aunque la mayoría de los organismos necesitan pequeñas cantidades de ciertos metales, los cuales son nutrientes esenciales (desempeñan funciones esenciales)^{8,10}, sus ingresos inadecuados deterioran las funciones tisulares, por esto debe coexistir un equilibrio entre exceso y defecto en lo que se refiere a estos metales esenciales^{9,10,11}. Entre los metales encontramos aquellos que tienen mayores efectos toxicológicos y ecotoxicológicos en ambientes acuáticos; estos son los contaminantes ambientales más peligrosos, debido a que no son biodegradables y tiene capacidad de bioacumulación en los organismos vivos¹¹. Entre estos podemos citar al Hg, As, Cr, Pb y Cd; además, la sensibilidad de los organismos marinos a los metales pesados varía de una especie a otra⁸. Los factores que pueden influenciar en la

mayor o menor captación de los metales en las especies marinas son la disponibilidad del metal en solución, relacionado directamente al pH del medio, la concentración del oxígeno disuelto, la dieta de la especie, entre otros factores.

El estudio sobre la concentración de metales pesados en especies marinas del mar peruano es aún insuficiente. Si bien es cierto, hay algunos estudios que evalúan las concentraciones de determinados metales en especies ampliamente consumidas por la población (por lo general, especies que no se desarrollan cerca a la costa); sin embargo, hay pocos estudios sobre especies marinas que se desarrollan cerca a la costa, siendo la zona costera la que sufre mayor impacto por las descargas antropogénicas.

Este trabajo evalúa las concentraciones de los elementos arsénico (As), cadmio (Cd), cobre (Cu), manganeso (Mn), selenio (Se) y zinc (Zn) presentes en el tejido muscular y hepático de la especie marina pintadilla (*Cheilodactylus variegatus Valenciennes, 1833*), especie de la que no se dispone de datos o evaluaciones de las concentraciones de estos elementos presentes en sus tejidos. El interés de evaluar esta especie se centra en que, al desarrollarse en la zona costera, es susceptible de ser afectada por las descargas antropogénicas y la contaminación, las que pueden impactar a la especie y al hábitat donde se desarrolla. Se evaluó los niveles de estos elementos presentes en el tejido muscular y tejido hepático para evaluar las diferencias en concentración presentes en estos tejidos por zona y; además, para evaluar la capacidad de bioacumulación que tiene el hígado en esta especie. Asimismo, se evaluó la correlación que existe en las concentraciones presentes entre ambos tipos de tejido.

PARTE EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de este estudio, se utilizó como especie marina a investigar la pintadilla (*Cheilodactylus variegatus Valenciennes, 1833*). Este estudio comprendió la zona costera de Lima, para lo cual se seleccionaron dos puntos de recolección de muestras: el Mercado Pesquero Artesanal de Chorrillos y el Mercado Pesquero Artesanal de Ancón, en el periodo comprendido entre setiembre 2018 a marzo 2019. Se recolectaron y analizaron un total de 32 muestras de la especie marina, con una medida de 23 +/- 2 cm (medida que comprende desde la boca del pez hasta el final de la aleta caudal), en cada una de las cuales se separó el tejido muscular (zona dorsal y ventral) y el tejido hepático, los que fueron debidamente lavados, enjuagados con agua ultrapura y seccionados adecuadamente. El método de digestión está basado en el método 200.3 de la US EPA, edición 1991¹², "Preparación de muestras para la determinación espectroquímica de elementos recuperables totales en tejidos biológicos", sometiendo la muestra a digestión ácida, pesándose aproximadamente 5 g para el tejido muscular y 1 g para el tejido hepático (ambos tejidos frescos, en base húmeda) con ácido nítrico concentrado p.a. y peróxido de hidrógeno al 30 % p.a., en sucesivas adiciones, en caliente (entre 92 a 95 °C) de manera controlada (mediante un lento reflujo), consiguiéndose la eliminación de toda la materia orgánica y la disolución de los metales presentes en el tejido. Una vez frío, el digestado se trasladó a fiole de 50 ml, se enrasó con agua ultrapura y agitó, dejándose reposar para la separación de algún material insoluble que pudiese quedar.

Con esta solución obtenida, se determinó la concentración de los elementos siguientes: arsénico (As), cadmio (Cd), cobre (Cu), manganeso (Mn), selenio (Se) y zinc (Zn) por el espectrofotómetro de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES: Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectrometry), siendo el equipo empleado de la marca Varian (hoy Agilent), modelo Varian 725-ES. Mediante esta técnica, la solución acuosa se convierte en aerosol mediante un nebulizador y se transporta al plasma (de gas argón ionizado) el que se mantiene mediante un campo de radiofrecuencia. Aquí, en el plasma (que produce temperaturas de 7000 K a 10 000 K), la muestra es secada, atomizada e ionizada, emitiendo los átomos e iones sus longitudes de onda características, las que son monitoreadas por un policromador computarizado y con su correspondiente detector. La intensidad de esta emisión se correlaciona directamente con la concentración de analito presente. Para la cuantificación de los metales se prepararon soluciones de calibración a partir de un estándar certificado multielemental de la marca Inorganic Ventures (1 ppm, 2 ppm y 5 ppm) con su respectivo blanco de calibración (0 ppm) en medio nítrico, elaborando el equipo de manera interna, mediante el software respectivo, la curva de calibración espectrofotométrica de emisión (cuentas) vs. concentración del metal (en ppm). Para la lectura y operación del equipo se toma como referencia el Método 6010D de la US EPA, revisión 5¹³, “Espectroscopia de Emisión Óptica-Plasma Acoplado Inductivamente”, en donde se indican las pautas a considerar para la medición de las concentraciones de los elementos ya indicados.

Junto con las muestras de tejido de pescado, los controles de calidad analítico, propio de una determinación química, contempló el uso de dos blancos de análisis, un duplicado por cada 5 muestras y patrón certificado: material de referencia DORM 4 Fish Protein Certified Reference Material for Trace Metals and other Constituents de la National Research Council de Canadá, por cada corrida analítica. Todos estos controles de calidad son sometidos al mismo proceso analítico al igual que las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó la especie marina pintadilla (*Cheilodactylus variegatus* Valenciennes, 1833) por ser un pescado consumido por la población (aunque su consumo no es tan difundido como el jurel o el bonito), requerido por restaurantes (cevicherías, comida criolla entre otros) para la preparación de platos marinos. Las muestras de pintadilla se adquirieron del Mercado Pesquero Artesanal de Chorrillos y del Mercado Pesquero Artesanal de Ancón (periodo de setiembre 2018 a marzo 2019), donde la especie es capturada por pescadores artesanales de la zona.

Se analizaron 32 muestras de tejido muscular y 32 muestras de tejido hepático (18 muestras por cada punto de muestreo). El muestreo fue cada dos meses y en cada uno de estos se recolectaron y analizaron cuatro muestras de la especie pintadilla. En la tabla 1, en el total de muestras, se reportan las medias más la desviación estándar de los elementos analizados en las muestras recolectadas en el Mercado Pesquero Artesanal de Chorrillos y el Mercado Pesquero Artesanal de Ancón.

Tabla 1. Concentración de elementos (mg/kg) en el tejido muscular y hepático de la pintadilla (*Cheilodactylus variegatus Valenciennes, 1833*).

Elemento	Tejido muscular (mg/kg)		Tejido hepático (mg/Kg)		LOD (mg/Kg)	LOQ (mg/Kg)
	Ancón	Chorrillos	Ancón	Chorrillos		
As	0,87+/-0,33	0,79+/-0,39	2,94+/-1,13	2,57+/-0,97	0,20	0,67
Cd	<0,05	<0,05	4,82+/-2,31	3,75+/-1,76	0,05	0,17
Cu	0,264+/-0,060	0,234+/-0,098	5,646+/-2,218	7,755+/-3,049	0,040	0,133
Mn	<0,08	<0,08	0,97+/-0,28	1,05+/-0,20	0,08	0,27
Se	0,75+/-0,25	0,78+/-0,24	3,81+/-0,81	4,55+/-1,24	0,20	0,67
Zn	3,804+/-0,696	3,453+/-0,910	50,750+/-16,122	49,823+/-9,839	0,100	0,333

Nota: Periodo comprendido entre setiembre 2018 a marzo 2019. **LOD:** Límite de detección del método, **LOQ:** Límite de cuantificación del método.

De los datos observados en la tabla 1, los valores reportados para el cadmio y el manganeso en el tejido muscular son menores al límite de detección del método (en el caso del cadmio es 0,05 mg/kg y en el caso del manganeso 0,08 mg/kg).

En la tabla 2 se presenta un resumen de los estadísticos descriptivos para los elementos involucrados en este estudio tanto para el músculo (tejido muscular) y el hígado (tejido hepático).

Tabla 2. Estadísticos descriptivos de la concentración de metales (mg/kg) en el tejido muscular y hepático de la pintadilla (*Cheilodactylus variegatus Valenciennes, 1833*)

	Cd		Cu		Mn		Zn					
	Hígado		Hígado		Músculo		Hígado		Músculo			
	Ancón	Chorrillos	Ancón	Chorrillos	Ancón	Chorrillos	Ancón	Chorrillos	Ancón	Chorrillos		
n	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	
Media	4,82	3,75	5,646	7,755	0,264	0,234	0,97	1,05	50,750	49,823	3,804	3,453
95 % Lim. de IC	3,59	2,81	4,464	6,130	0,232	0,182	0,82	0,94	42,160	44,580	3,434	2,968
Lim. de la media Sup.	6,05	4,69	6,828	9,380	0,296	0,286	1,12	1,15	59,341	55,066	4,175	3,938
Mediana	5,15	3,28	6,054	7,581	0,259	0,201	0,92	1,03	46,763	47,278	3,700	3,104
Desv. Est.	2,31	1,76	2,218	3,049	0,060	0,098	0,28	0,20	16,122	9,839	0,696	0,910
Mínimo	1,44	1,56	2,094	2,322	0,174	0,133	0,57	0,70	31,260	36,688	2,770	2,653
Máximo	8,17	7,21	8,861	14,416	0,387	0,512	1,59	1,39	84,767	69,608	4,843	5,717

En el caso del cadmio y el manganeso en el tejido muscular, no se presentan estadísticos descriptivos porque todos los valores reportados en las muestras son menores al límite de detección del método. Por esto, para el caso del cadmio se reportaría como media de los resultados $<0,05$ mg/kg y para el manganeso $<0,08$ mg/kg (Véase tabla 1).

En la tabla 3 se presenta un resumen de los estadísticos descriptivos para los elementos no comprendidos en la tabla 2 (en esta tabla arsénico y selenio) involucrados en este estudio tanto para el músculo (tejido muscular) y el hígado (tejido hepático).

Tabla 3. Estadísticos descriptivos de la concentración de arsénico y selenio (mg/kg) en el tejido muscular y hepático de la pintadilla (*Cheilodactylus variegatus* Valenciennes, 1833).

	As				Se				
	Hígado		Músculo		Hígado		Músculo		
	Ancón	Chorrillos	Ancón	Chorrillos	Ancón	Chorrillos	Ancón	Chorrillos	
n	16	16	16	16	16	16	16	16	
Media	2,94	2,57	0,87	0,79	3,81	4,55	0,75	0,78	
95 % de IC de la media	Lim. Inf.	2,33	2,05	0,69	0,58	3,38	3,89	0,61	0,65
	Lím. Sup.	3,54	3,08	1,05	1,00	4,24	5,21	0,88	0,91
Mediana		2,63	2,56	0,91	0,70	3,78	4,28	0,72	0,78
Desv. Est.		1,13	0,97	0,33	0,39	0,81	1,24	0,25	0,24
Mínimo		1,69	1,02	0,39	0,38	2,09	3,13	0,46	0,47
Máximo		5,43	4,19	1,76	1,68	4,82	7,26	1,41	1,25

Todos los resultados fueron sometidos a una evaluación estadística para determinar si los resultados describen una distribución normal en el tejido muscular y hepático de la especie marina *Cheilodactylus variegatus* Valenciennes, 1833, “pintadilla”. Se emplea la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, que aplica para muestras menores a 50 resultados, obteniéndose que, para la mayor parte de los resultados, estos describen una distribución normal ($p > 0,05$). En la tabla 4 se muestra, de manera resumida, la distribución de los resultados para cada tipo de elemento de acuerdo al tipo de tejido analizado.

Tabla 4. Tipos de distribución estadística de los diferentes elementos en el tejido muscular y hepático de la pintadilla (*Cheilodactylus variegatus* Valenciennes, 1833).

	As		Cd		Cu		Mn		Se		Zn	
	A	Ch	A	Ch	A	Ch	A	Ch	A	Ch	A	Ch
Tejido Hepático	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N
Tejido Muscular	N	L	--	--	N	L	--	--	N	L	N	L

Nota: Puntos de muestreo **A:** Ancón, **Ch:** Chorrillos. Tipos de distribución estadística **N:**

Distribución normal, **L:** Distribución no normal o libre.

En base a estos resultados, se evaluó si existen diferencias significativas en las medias de la concentración de los diferentes elementos, tanto en el tejido muscular como en el tejido hepático, de la especie en estudio en las zonas de Chorrillos y Ancón.

Para esto, en los datos paramétricos (por cumplir los criterios de normalidad de resultados y homogeneidad de varianzas) se emplea la prueba de la *t* de student (aplicado a los resultados del cadmio: hígado, cobre: hígado, manganeso: hígado y selenio: músculo) mientras que a los datos no paramétricos se emplea la prueba *U* de Mann-Whitney (aplicado a arsénico: hígado y músculo, cobre: músculo, selenio: hígado y zinc: hígado y músculo) obteniéndose que, para todas las muestras (con excepción de Cu: hígado) no existe una diferencia significativa entre las medias de las concentraciones de los elementos en estudio de las muestras provenientes de las zonas de Chorrillos (Mercado Pesquero Artesanal de Chorrillos) y Ancón (Mercado Pesquero Artesanal de Ancón), al obtenerse un $p > 0,05$ (descartándose la hipótesis nula (H_0)). En el caso de las muestras de hígado, para el elemento cobre, se evidenció estadísticamente mediante la prueba de la *t* de student que, sí existen diferencias significativas en las medias de la concentración de este elemento entre las zonas de Chorrillos y Ancón, donde las concentraciones promedio de cobre en la zona de muestreo de Chorrillos es de 7,755 mg/kg de Cu mientras que en la zona de Ancón es de 5,646 mg/kg de Cu, mostrándose que en Chorrillos la concentración de cobre en el tejido hepático es mayor que en la zona de Ancón.

Comparando la concentración de cadmio (Cd) en los tejidos de la pintadilla con el contenido máximo establecido por el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera- SANIPES (basado en el establecido por la Unión Europea), que es de 0,05 mg/kg en peso fresco o húmedo sobre la carne de pescado (tejido muscular), se observa que en ninguna de las muestras analizadas se excede dicho nivel, con lo cual se infiere que su consumo por la población es aceptable para este elemento y que no afecta a la salud. Para los demás elementos, este reglamento no tiene contenidos máximos establecidos para el pescado de consumo humano. En el caso del tejido hepático, se observa que este sí excede con creces el contenido máximo permitido, pero la norma se centra en la parte consumible del pez (extrayéndose el tracto digestivo), por lo que, estos valores, que en promedio reportan para la zona de Chorrillos 3,75 mg/kg y para la zona de Ancón 4,82 mg/kg (muy superiores al valor no detectable de $< 0,05$ mg/kg del tejido muscular) representa la capacidad bioacumuladora que presenta este órgano en la especie marina. No solo se evidencia esta tendencia en el cadmio, sino en todos los demás elementos que están siendo evaluados en el presente estudio (véase la tabla 1), poniendo como ejemplo el arsénico que, para la zona de Ancón, en el tejido muscular la concentración promedio es de 0,87 mg/kg mientras que en el tejido hepático esta concentración es de 2,94 mg/kg (la razón hígado/músculo es aproximadamente 3) mientras que para la zona de Chorrillos, en el tejido muscular la concentración promedio es de 0,79 mg/kg mientras que en el tejido hepático esta concentración es de 2,57 mg/kg (también la razón hígado/músculo es aproximadamente 3). Esta relación de concentraciones hígado/músculo, en el caso del cobre oscila entre 25 a 30 aproximadamente, selenio oscila entre 5 a 6 y en el zinc oscila entre 14 a 15 aproximadamente, lo que evidencia experimentalmente la capacidad del hígado de acumular estos elementos.

La pintadilla, una especie bentónica que se desarrolla en las cercanías de la costa y se alimenta de una gama de pequeños invertebrados marinos, siendo la dieta de esta especie compuesta mayormente por crustáceos y moluscos. De acuerdo con esto, la pintadilla se encuentra en un punto intermedio de la red trófica, lo que le permite bioacumular metales y elementos tóxicos (como arsénico y selenio), los que son captados de las especies que depreda. El tejido hepático es un buen indicador de la contaminación ambiental, teniendo el hígado la capacidad de acumular contaminantes del entorno donde se desarrolla la especie. El hígado cumple un papel importante en el almacenamiento, redistribución, desintoxicación y transformación de contaminantes consumidos por el pez¹⁴, siendo las formas liposolubles almacenadas en este órgano, a diferencia del tejido muscular (que representa la parte “comestible” de la especie, de ahí que la concentración de elementos metálicos y no metálicos influyen directamente sobre la salud de la población). Asimismo, se sugiere la posibilidad de que el hígado de los animales acuáticos puede actuar como un órgano para la desmetilación del mercurio y de secuestro de formas orgánicas e inorgánicas de este elemento y otros elementos metálicos del cuerpo del pez¹⁵. De esta manera, se produce la acumulación en el hígado de elementos metálicos y no metálicos, en cantidades superiores al tejido muscular.

Las especies que se desarrollan en las cercanías de la costa, que es el hábitat de la pintadilla, son directamente afectadas por la contaminación por fuentes antropogénicas, básicamente producto de las descargas domésticas e industriales que son vertidas al mar (en algunos casos descargas clandestinas y sin tratamiento previo) en la zona de nuestro estudio, comprendida entre Chorrillos y Ancón, en la costa de Lima.

Líneas arriba, se indicó que, haciendo una comparación entre los puntos de recolección de la especie marina, se observa que las concentraciones de elementos totales en el punto de recolección de Chorrillos (Mercado Pesquero Artesanal de Chorrillos) no presentan diferencias significativas con respecto a las concentraciones reportadas en el punto de muestreo de Ancón, en ambos tipos de tejidos (muscular y hepático), con excepción del cobre en el tejido hepático, pudiéndose inferir que en la zona de nuestro estudio, los niveles de los elementos evaluados son constantes. Se hacen necesarios estudios adicionales para corroborar lo indicado en este artículo, así como también ampliar el alcance de este, evaluando los niveles de concentración de los elementos estudiados, tanto en las especies que consume la pintadilla como en el agua de mar y el sedimento marino. Cabe recalcar, que este es el primer estudio de evaluación de la presencia de elementos metálicos y no metálicos en los tejidos muscular y hepático de la pintadilla.

Estadísticamente, se buscó si hay correlación entre las concentraciones de los elementos en estudio presente en el tejido muscular y el tejido hepático, tanto en la zona de Chorrillos como en la zona de Ancón. Se aplicaron las pruebas de Pearson (prueba paramétrica) y la rho de Spearman (prueba no paramétrica). Para el caso del arsénico, para ambos puntos de muestreo se evidencia la correlación positiva entre la concentración de este metaloide en el tejido muscular y el tejido hepático, siendo el coeficiente de correlación de Spearman de 0,588 (Ancón) y 0,771 (Chorrillos) mostrándose una correlación fuerte. Para el cobre no se evidencia correlación. En el caso del selenio se evidenció la correlación positiva solo en la

zona de Ancón, con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,525 (correlación fuerte), y en el caso del zinc se evidenció la correlación positiva solo en la zona de Chorrillos, con un coeficiente de correlación de Spearman de 0,541 (correlación fuerte). Para los casos del manganeso y cadmio no se pudo desarrollar esta correlación, ya que las concentraciones de estos elementos en el tejido muscular son menores al límite de detección del método (véase la tabla 1). Estas diferencias en la correlación pueden ser debido a las diferencias en el metabolismo de la especie, las cuales pueden ser afectadas por factores externos como el pH, la concentración de oxígeno disuelto, materia orgánica disponible, madurez sexual, sensibilidad a la estación, la calidad del agua y la contaminación ambiental, entre otros¹⁴; siendo necesarios estudios complementarios que corroboren la tendencia de que, a mayor concentración del elemento en el tejido muscular, habría mayor concentración en el tejido hepático. En el estudio desarrollado en la Bahía de Guanabara (Brasil), se encontró una correlación positiva alta entre la concentración del metal mercurio encontrado en el tejido muscular y el tejido hepático de especies carnívoras ($r = 0,91$)¹⁵, lo cual, comparado con la pintadilla, que es una especie básicamente carnívora (carcinófaga, preferentemente) confirmaría la correlación positiva fuerte que se presentó en los elementos arsénico, selenio (zona Ancón) y zinc (zona Chorrillos).

Para la evaluación de la calidad analítica de los resultados, las muestras de tejido de la especie marina fueron analizadas junto con un estándar certificado cuya denominación es Material de referencia DORM 4 Fish Protein Certified Reference Material for Trace Metals and other Constituents de la National Research Council de Canadá para la evaluación de la exactitud y reproducibilidad del análisis instrumental. La tabla 5 reporta un resumen de los porcentajes de recuperación individuales y promedio para los elementos en estudio.

Tabla 5. Porcentaje de recuperación del material certificado de referencia DORM-4 en los diversos análisis realizados.

Elemento	Valor certificado (mg/kg)	Ensayo 1 (%)	Ensayo 2 (%)	Ensayo 3 (%)	Ensayo 4 (%)	Recuperación promedio (%)
As	6,87	85,75	88,96	101,85	95,67	93,06
Cd	0,299	91,47	84,84	93,42	87,12	89,21
Cu	15,7	89,10	90,78	99,43	95,50	93,70
Mn	3,17	99,80	86,09	95,13	96,78	94,45
Se	3,45	89,87	108,27	96,29	83,44	94,47
Zn	51,6	90,33	92,36	99,84	94,19	94,18

Este material certificado de referencia nos permite asegurar la calidad de los resultados instrumentales, tanto la repetibilidad como la reproducibilidad de los resultados analíticos. El DORM-4 es proteína de pescado seca y es utilizado para el desarrollo y verificación de métodos analíticos en los cuales se determine elementos traza en tejidos de fauna marina y

matrices similares. Para materiales de referencia sólidos, como el DORM-4, es posible que no se pueda lograr una recuperación de +/- 20 % debido a la complejidad de la matriz, por esto, en ausencia de datos históricos, los límites de aceptación deben establecerse en +/- 20 %¹³. En la tabla 5 se observa que los resultados están dentro de los límites de aceptación indicados, pues las recuperaciones promedio son superiores al 89 % y de manera individual en los ensayos el mínimo valor de recuperación es del 84,84 % para el cadmio y el máximo valor es de 108,27 % para el caso del selenio.

CONCLUSIONES

La especie marina pintadilla (*Cheilodactylus variegatus* Valenciennes, 1833) recolectada en los mercados pesqueros artesanales de Chorrillos y Ancón, durante el periodo comprendido entre setiembre 2018 a marzo 2019, presentó concentraciones de As, Cd, Cu, Mn, Se y Zn mayores en el tejido hepático, en comparación al tejido muscular, lo que evidencia la capacidad bioacumuladora de este órgano en la especie marina.

La concentración de Cd y Mn en el tejido muscular es menor al límite de detección, reportándose para el cadmio <0,05 mg/kg y para el manganeso <0,08 mg/kg, reportándose para los demás elementos concentraciones por encima del límite de detección del método. En el caso del tejido hepático, todos los elementos mostraron concentraciones cuantificables. Las concentraciones medias reportadas para los elementos en estudio no muestran diferencias significativas entre los puntos de muestreo de Ancón y Chorrillos, con excepción del elemento cobre, el cual sí mostró una diferencia significativa de la concentración media para el tejido muscular, presentando la zona de Chorrillos (7,755 mg/kg) una concentración mayor en comparación a la zona de Ancón (5,646 mg/kg).

Se evidenció que existe una correlación positiva fuerte entre la concentración de arsénico en el tejido muscular y la concentración de arsénico en el tejido hepático para ambos puntos de recolección de muestra. Para el caso de selenio se encontró correlación en la zona de Ancón y el caso del zinc en la zona de Chorrillos. En el caso del cobre no se encontró alguna correlación entre la concentración de este metal en el tejido muscular y el tejido hepático. En comparación con los contenidos máximos permitidos por el SANIPES, el cadmio (0,05 mg/kg) presente en el tejido muscular no excede dicho límite, por tanto, su consumo por la población es aceptable y que no afecta a la salud. En esta normativa no está contemplada la concentración en el tejido hepático.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a la Jefa del Laboratorio de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental de la UCV, Ing. Amelia Mudarra, por las facilidades brindadas para la realización de los ensayos químicos, a la Ingeniero Químico Erika Bustamante por el apoyo profesional en el desarrollo del trabajo de investigación, al Químico David Huaranga y al Químico Julio

Trauco por el apoyo técnico y profesional brindado al desarrollo de esta investigación, a los ingenieros ambientales Romario Velásquez, Laydy Cruz y Gino Mora por el apoyo técnico en el desarrollo de los análisis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chirichigno N, Vélez J. Clave para Identificar los Peces Marinos del Perú [Internet]. 2da. Ed. Callao: Instituto del Mar del Perú; 1998. [Citado 12 jul 2021]. Disponible en <https://hdl.handle.net/20.500.12958/3327>
2. Vargas L, Pequeño G. Hallazgo de bilagai (*Cheilodactylus variegatus Valenciennes*, 1833), en la Bahía Metri en Chile: (Osteichthyes: Cheilodactylidae). *Investig Mar*. 2001; 29(2): 35-37. doi: 10.4067/S0717-71782001000200004
3. Reyes P, Hüne M. Peces del Sur de Chile [Internet]. Santiago: Ocho Libros; 2012. [Citado 10 jul 2021]. Disponible en https://www.ocholibros.cl/libro/peces-del-sur-de-chile_419
4. Kong I, Castro H. Guía de biodiversidad N° 3: Volumen 1 Macro fauna y Algas Marinas: Peces [Internet]. Antofagasta: Centro Regional de Estudios y Educación Ambiental; 2002 [Citado 10 jul 2021]. Disponible en <http://intranetua.uantof.cl/crea/guia%20peces.pdf>
5. Chang V. La Pintadilla: El ABC de su pesca. *Revista Pesca* [Internet]. 2010. [Citado 12 jul 2021]; 113(10-10): 74- 85. Disponible en: http://files.capturaylibera.webnode.mx/200000231-b582db67ca/revista_pesca_noviembre_2010.pdf
6. Medina M, Araya M, Vega C. Alimentación y relaciones tróficas de peces costeros de la zona norte de Chile: Feeding and trophics relation ships of coastal fish off northern Chile. *Investig Mar*. 2004; 32(1): 33-47. doi: 10.4067/S0717-71782004000100004
7. Palma A, Ojeda P. Abundance, distribution and feeding patterns of a temperate reef fish in subtidal environments of the Chilean coast: the importance of understory algal turf. *Rev Chil Hist Nat*. 2002; 75(1): 189-200. doi: 10.4067/S0716-078X2002000100018
8. Gutiérrez-Galindo E. Comentario Sobre El Metabolismo De Metales Pesados En Organismos Marinos. *Ciencias Marinas*. 1982; 8(1): 134–138. doi: 10.7773/cm.v8i1.364
9. Castro P, Huber M. *Biología Marina*. 6ta Ed. Madrid: Mc Graw Hill/ Interamericana de España S.A.U.; 2007.
10. Alarcón-Corredor O. Los elementos traza. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA* [Internet]. 2009. [Citado: 2021 Jul 19]; 4(3): 107-124. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/31376/articulo3.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
11. Orozco C, Pérez A, Gonzales M, Rodríguez F, Alfayate J. *Contaminación Ambiental: Una visión desde la Química*. Madrid: Paraninfo; 2011.
12. United States Environmental Protection Agency. Method EPA 200.3 “Sample Preparation Procedure for Spectrochemical Determination of Total Recoverable Elements in Biological Tissues. Revision 1 [Internet]. Washington DC: Headquarters Library Environmental Protection Agency; 1991[Citado 5 jul 2021]. Disponible en: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/20017TYT.PDF?Dockey=20017TYT.PDF>

13. United States Environmental Protection Agency. Method 6010D (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry," Revision 5. [Internet]. Washington DC: 2018 [Citado 5 jul 2021]. Disponible en: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/6010d.pdf>
14. Havelková M, Dušek L, Némethová D, Poleszczuk G, Svobodová Z. Comparison of Mercury Distribution Between Liver and Muscle – A Biomonitoring of Fish from Lightly and Heavily Contaminated Localities. *Sensors*. 2008; 8(7): 4095-4109. doi: 10.3390/s8074095
15. Baêta P, Kehrig H, Malm O, Moreira I. Total mercury and methylmercury in fish from a tropical estuary. *Environmental Toxicology*. En: Kungolos A, Brebbia C, Samaras C, Popov V. (Eds.). *First International Conference on Environmental Toxicology*; 11-13 Setiembre 2006; Mykonos, Grecia. Southampton: WIT Press; 2006. P. 183-192. doi: 10.2495/ETOX060181

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE GRAFENO MULTICAPA MAGNETIZADO

Mercedes Puca Pacheco^{*a}, María Guadalupe Neira Velázquez^b

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo la síntesis y caracterización de grafeno multicapa magnetizado y para ello se propuso un diseño factorial 2^2 con un punto central, para evaluar el efecto del tamaño de las nanopartículas de grafito y la relación másica de magnetita/grafeno sobre la magnetización. El grafeno multicapa magnetizado se obtuvo en dos etapas, en la primera se sonificó el grafito con dodecilsulfato de sodio (SDS) en medio acuoso y en la segunda etapa se realizó la coprecipitación *in situ* de la magnetita, logrando la formación de las nanoláminas de grafeno multicapa. Mediante el análisis por espectroscopia Raman se encontró la formación de grafeno multicapa. Mediante los resultados de la difracción de rayos X se verificó la fase cristalina de la magnetita y el grado de cristalinidad. Mediante análisis morfológico, utilizando el microscopio de barrido (SEM), se confirmaron las características microestructurales de estos materiales. En conclusión, la magnetización del material compuesto de grafeno y magnetita no depende de la relación másica de magnetita/grafeno porque el grafeno fue magnetizado y tampoco depende de los tamaños de partículas del grafito sonificado y grafeno multicapa magnetizado.

Palabras claves: Magnetita, grafeno multicapa, magnetización, cristalinidad, grafito.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF MAGNETIZED MULTILAYER GRAPHENE

ABSTRACT

The present research aimed at the synthesis and characterization of magnetized multilayer graphene and for this, a 2^2 factorial design with a central point was proposed, to evaluate the effect of the size of the graphite nanoparticles and the magnetite / graphene mass ratio on magnetization. The magnetized multilayer graphene was obtained in two stages, in the first the graphite was sonified with sodium dodecyl sulfate (SDS) in aqueous medium and in the second stage the magnetite *in situ* coprecipitation was carried out, achieving the formation

^a Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos UNMSM. Av. Germán Amézaga N° 375, Lima 01, CP 15081, Perú. email: mpucap@gmail.com

^b Centro de Investigación en Química Aplicada, Blvd. Enrique Reyna Hermosillo, No. 140, Col. San José de los Cerritos, CP. 25294, Saltillo, Coahuila, México.

of multilayer graphene. By means of the analysis by Raman spectroscopy the formation of multilayer graphene was found. By means of the X-ray diffraction results, the crystalline phase of the magnetite and the degree of crystallinity were verified. By morphological analysis using the scanning microscope (SEM), the microstructural characteristics of these materials were confirmed. In conclusion, the magnetization of the composite material of graphene and magnetite does not depend on the mass ratio of magnetite / graphene because the graphene was magnetized and neither does it depend on the particle sizes of the sonified graphite and magnetized multilayer graphene.

Key words: Magnetite, multilayer graphene, magnetization, crystallinity, graphite.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el grafeno ocupa un lugar importante y está permitiendo abrir nuevas vías al desarrollo de materiales funcionales por su obtención a partir de un material barato como el grafito. El grafeno es una nanoestructura de carbono bidimensional (2D), con hibridación sp^2 , que ha sido de gran interés en las comunidades de física, química y materiales en todo el mundo desde que fue descubierto por Geim y Novoselov¹, quienes usaron cinta adhesiva “scotch” para despegar láminas de grafeno a partir del grafito. El interés por el grafeno se debe a sus excelentes propiedades tales como: alta conductividad térmica², la resistencia mecánica comparable a la de los nanotubos de carbono que lo han convertido en material de gran interés de estudio en muchas investigaciones del siglo XXI³, con un módulo de Young de 1 Terapascal, es 100 veces más resistente que el acero y 6 veces más ligero que el mismo y mejora las propiedades térmicas y ópticas³, las buenas propiedades de transporte⁴ y su considerable efecto termoeléctrico⁴, la cual hace que el grafeno sea una gran promesa para su uso en diversos materiales de almacenamiento de energía⁵, sistemas de suministro de fármacos⁶, biosensores⁷, compuestos poliméricos⁸, supercondensadores⁹, nanoelectrónica¹⁰ y en otras áreas.

Los métodos de exfoliación oxidativa pueden producir potencialmente grandes cantidades de óxido de grafeno (GO), una nanocapa similar al grafeno que generalmente es defectuosa y requiere más tratamientos para reducirlo a óxido de grafeno reducido (RGO)¹¹. Sin embargo, las aplicaciones del grafeno siguen siendo limitadas debido a su alto costo y su baja capacidad de producción actual. Por ello, actualmente, la exfoliación de grafito es un enfoque prometedor para la producción a gran escala de grafeno. La exfoliación en fase líquida, mediante el empleo de disolventes orgánicos^{12,13} o surfactantes¹⁴, es una alternativa a la exfoliación mecánica que se basa en aumentar la distancia interlaminar entre las capas de grafito para disminuir las fuerzas de interacción (Van der Waals) existentes entre ellas y poder separar las láminas¹⁵.

En la presente investigación, se empleó la sonicación de una mezcla de grafito, tensioactivo (SDS) y agua, para la obtención de grafeno multicapa, y luego la precipitación de magnetita en la dispersión acuosa de grafeno multicapa. Una posible aplicación del nanocompuesto obtenido es en la limpieza de aguas contaminadas o aguas de mar por metales pesados, mediante remoción magnética, cuyo estudio se realizará en un futuro trabajo de investigación.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos y materiales

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron: dodecilsulfato de sodio (SDS) con pureza > 98,5 %, cloruro de hierro (II) ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), cloruro de hierro (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de amonio al 30 % m/m y ácido clorhídrico al 37 % m/m, suministrados por Merck Peruana. Para la síntesis del grafeno se empleó grafito de Sigma-Aldrich. Se empleó agua destilada, desionizada y filtrada. El nitrógeno fue de grado UAP de Infra, purificado adicionalmente al pasarlo por una columna Oxiclear.

Caracterización

La estructura cristalográfica y la presencia de la magnetita fueron analizadas por difracción de Rayos-X (DRX) empleando un difractor metro marca BRUKER, modelo D8-FOCUS. Generador de Rayos-X con voltaje de salida del tubo = 40 kV y corriente de salida del tubo = 40 mA en un rango de medición de 10 a 80 °C en la escala de 2 θ .

Las mediciones del tamaño de partícula se realizaron por dispersión de luz (DLS) en un equipo modelo Malvern Zetasizer Nano-ZS90 a 25 °C.

Las propiedades magnéticas de las nano-partículas fueron determinadas usando el Magnetómetro de Muestra Vibrante (MMV) modelo 6000 de Quantum Design, con un campo aplicado entre -20,0 a 20,0 kOe a temperatura ambiente.

Se obtuvieron los espectros de las ondas correspondientes al grafeno con el espectrofotómetro Raman Horiba One Xplora, utilizando un láser de 785 nm con una potencia de 50 mW, de 0 a 3500 cm^{-1} .

Para el estudio morfológico se empleó un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) XL-20 de Phillips, en donde las muestras fueron analizadas con un voltaje entre 6,5 y 15 kV y magnificaciones entre 1000 y 10000 x.

Diseño experimental

Se planteó un diseño 2² con un punto central, siendo las variables independientes el tiempo de dispersión del grafito y relación másica de magnetita/grafeno (RMG) (Ver tabla 1)

Tabla 1. Diseño factorial 2² con un punto central.

Código	Diseño factorial [Tiempo(h)] [RMG]	Tiempo de sonicación del grafito (h)	Relación málica Magnetita/Grafeno (RMG) (%)
MA	(-) (-)	5	40/60
MB	(-) (+)	5	60/40
MC	(0) (0)	10	50/50
MD	(+) (-)	15	40/60
ME	(+) (+)	15	60/40

Obtención del grafito con diferentes tamaños de partícula

Para ello se llevó a cabo la dispersión de una mezcla compuesta por 5 g de grafito; 0,5 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) y 300 mL de agua destilada, mediante el empleo de un baño de ultrasonido modelo S30H "ELMA" ALEMAN", por un tiempo de 5 horas, a una temperatura constante de 40 °C. Se realizaron éstas mezclas, de la misma manera, para otros tiempos de dispersión de 10 y 15 horas. (ver tabla 2).

Tabla 2. Muestras de grafito dispersado por ultrasonido.

Código	Tiempo de agitación por ultrasonido (h)
MF	5
MG	10
MH	15

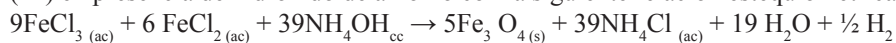
Síntesis de la magnetita sobre grafito dispersado por ultrasonido

Una vez obtenidas las tres mezclas dispersadas de grafito MF, MG y MH obtenidas a diferentes tiempos, estas se vertieron por separado en balones de tres bocas de 500 ml; se calentaron hasta 70 °C, en ambiente inerte con nitrógeno gaseoso, se mantuvieron en agitación a una velocidad de 500 rpm y una vez alcanzada una temperatura constante de 70 °C, se adicionaron las cantidades necesarias de solución de FeCl₃ al 24 % m/v y FeCl₂ al 12 % m/v (para obtener proporciones de magnetita y grafito de 40/60, 60/40 y 50/50) y luego de 5 minutos se dosificó la cantidad necesaria de NH₄OH concentrado a un flujo volumétrico de 1 ml/min empleando una bomba de jeringa modelo New Era NE-550 y una vez finalizada la alimentación del NH₄OH, se dejó reaccionar por 1 hora adicional.

Una vez finalizada, se decantó el grafito o el grafeno multicapa magnetizado, luego se eliminó el líquido sobrenadante, después se filtró y se realizó el proceso de lavado del grafito

o grafeno multicapa magnetizado con agua bidestilada hasta obtener un pH de 7 en el líquido de filtrado. Finalmente, se colocó el papel de filtro con el grafito o grafeno magnetizado en una placa Petri y se llevó a secar en una estufa de secado a 50 °C durante 5 días.

La síntesis de las nanopartículas de magnetita (NPM) por el método de precipitación, fue llevada a cabo a partir de una solución formada por cloruro de hierro (II) y cloruro de hierro (III) en presencia de hidróxido de amonio con la siguiente relación estequiométrica:



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del tamaño de partícula del grafito por DLS

Se obtuvieron tamaños de partículas entre 206,7 y 243,9 nm, los cuales son mostrados en la tabla 3, y también podemos afirmar que a mayor tiempo de dispersión por ultrasonido se logra disminuir el tamaño de partícula (Ver figura 1).

Tabla 3. Diámetros de partícula del grafito por DLS.

CÓDIGO	Tiempo de agitación por ultrasonido (h)	Diámetro de partícula (nm)
MF	5	243,9
MG	10	226,9
MH	15	206,7

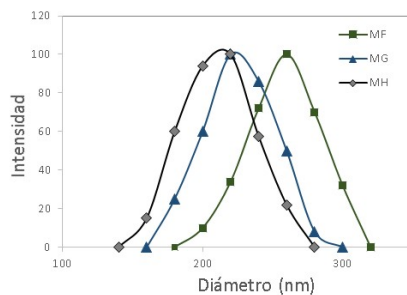


Figura 1. Distribución del tamaño de las partículas de grafito por DLS.

Análisis por difracción de rayos X de muestras de grafito magnetizado

En la figura 2, se muestran los difractogramas de las muestras: MA, MB, MC y MD en las cuales se formó la magnetita, mientras que en la muestra ME hubo formación de magnetita y goethita. Asimismo, se muestra que el grafito sonificado a 5, 10 y 15 h, las cuales corresponden a las muestras MF, MG y MH respectivamente, se observan solo Grafito H: Sistema Hexagonal y Grafito R: Sistema Romboédrico.

Mediante el difractograma de rayos X, se evidencia la formación de la magnetita cristalina por la presencia de los picos de difracción intensos indexados a (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) y (4 4 0) planos que aparecen en $2\theta = 30,15; 36,27; 43,32; 53,89; 57,13$ y $62,29^\circ$, respectivamente, son consistentes con los datos XRD estándar para la fase cúbica Fe_3O_4 con una estructura cúbica centrada en las caras (fcc).

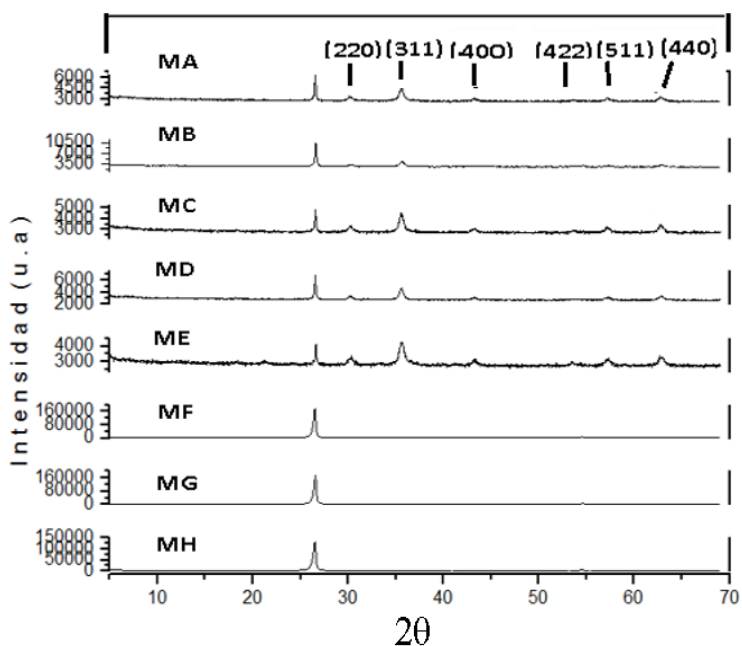


Figura 2. Comparación de difractogramas de rayos X de los nanocompuestos (MA, MB, MC, MD y ME) y grafito (MF, MG y MH).

El diámetro de la magnetita se calculó a partir de los difractogramas de rayos X, mediante la anchura a media altura (FWHM) del pico de reflexión del plano cristalino (311), siendo el pico más intenso de las reflexiones del perfil de DRX y se empleó la fórmula de Scherrer¹⁶ la cual viene dada por la ecuación 1.

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (1)$$

Donde K es una función de la forma de partículas, en este caso se consideró un valor de 0,9, λ es la longitud de onda del haz de rayos X, β es el ancho del pico a la altura media (FWHM) en radianes y θ el ángulo de Bragg en radianes.

A continuación, se muestra la tabla 4 con los diámetros de magnetita obtenidos en las muestras MA, MB, MC, MD y ME.

Tabla 4. Diámetro de partículas de magnetita.

Muestra	Tamaño de grano (nm)
MA	12,46
MB	12,13
MC	11,74
MD	15,69
ME	11,22

Análisis por espectroscopia Raman

En la figura 3, se muestra la comparación del espectro Raman del grafeno y del grafito medidos a 514,5 nm según Ferrari (2007)¹⁷. Se aprecian dos criterios de identificación: 1) Analizando las componentes del pico 2D, o 2) Analizando la razón de intensidades entre los picos G y 2D.

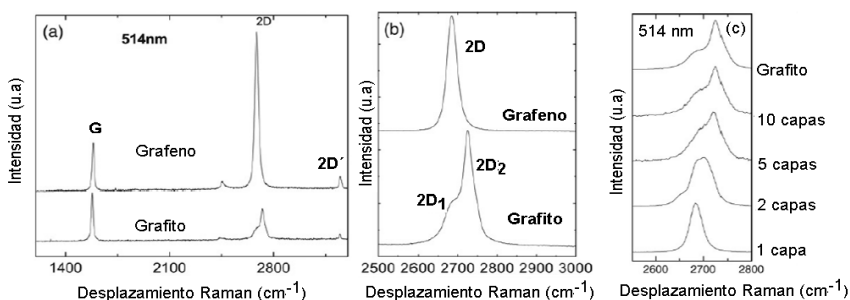


Figura 3. Espectro Raman del grafeno y grafito: (a) Con los picos G y 2D; (b) grafeno y grafito con los picos 2D para grafeno y 2D1 y 2D2 para grafito y (c) grafito y diferentes capas.

En la figura 4 se aprecian las bandas características del grafito, la imagen insertada muestra la forma del pico 2D típico de grafito en masa. La banda D es bastante pequeña, por lo que se deduce un alto orden estructural.

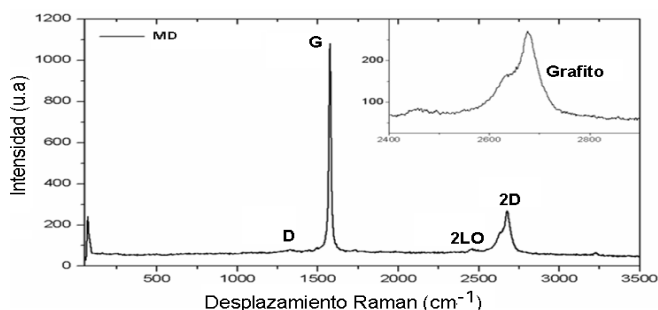


Figura 4. Espectro Raman de las nanopartículas de grafito-magnetita (% Magnetita = 60 %), con un tiempo de agitación por ultrasonido de 15 h.

En la figura 5, se aprecia el espectro Raman de la muestra MC con un 40 % de magnetita, la cual se diferencia de la muestra MD, que en la imagen insertada se distingue que la forma del pico 2D refleja, aproximadamente, 10 capas de carbono. Además, se logra observar que la banda D tiene una mayor intensidad, corroborando la presencia de estados de bordes.

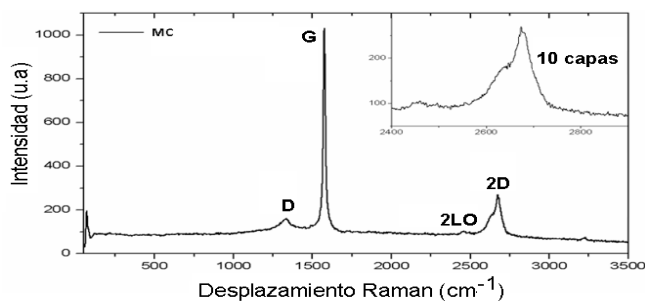


Figura 5. Espectro Raman de las nanopartículas de grafito-magnetita (%Magnetita = 40 %) con un tiempo de agitación por ultrasonido de 15 h.

En la figura 6, se muestra el espectro de la muestra ME, en la cual se observan los picos del grafito y en la imagen insertada se observa que el pico 2D muestra una ligera asimetría que corresponde a aproximadamente 5 capas de carbono.

Por otro lado, en la figura 6, se observan picos pequeños (alrededor de 200 cm^{-1}) que corresponden al óxido de hierro. La línea de fondo (background) ascendente denota una alta fluorescencia a consecuencia del mal enfoque en la superficie de medida, lo que se apoya en la premisa que se trata de pocas capas de grafeno sobre una nanopartícula de óxido de hierro (Magnetita).

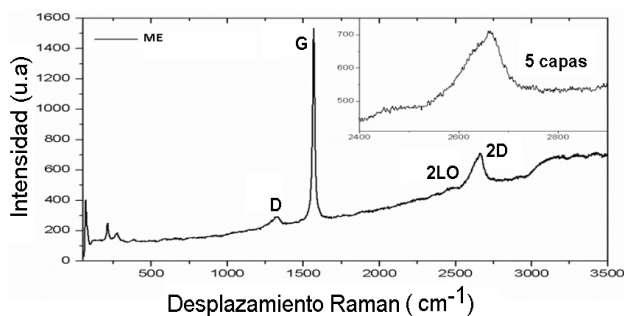


Figura 6. Espectro Raman de las nanopartículas de grafito-magnetita (RM = 50/50) con un tiempo de agitación por ultrasonido de 10 h.

En la figura 7, se muestran los espectros Raman para las muestras MA y MB, en la cual coinciden en casi todos los picos, salvo los indicados con flechas que corresponden al grafito, como se evidenció en las gráficas previas. Hacer un análisis cuidadoso del espectro en morado (el que presenta grafito) es imposible debido a la superposición de picos que dificultan poder determinar el número de capas, pero a simple vista se trataría de grafito en masa.

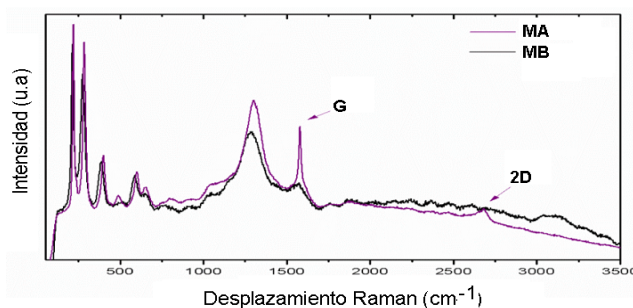


Figura 7. Espectro Raman de las nanopartículas de grafito-magnetita (RM = 60/40 y RM = 40/60) con un tiempo de agitación por ultrasonido de 5 h.

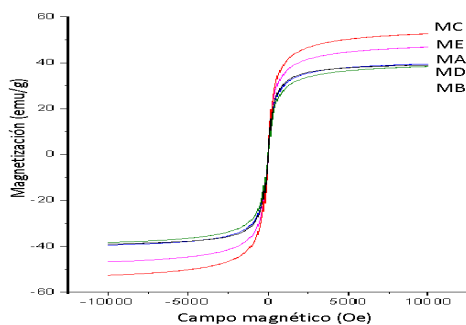
Análisis de magnetización

En la tabla 5 y figura 8, se muestran los resultados de las magnetizaciones de las muestras, encontrándose una alta magnetización con un valor de 52,21 emu/g en promedio, cuando el grafito se agitó por un tiempo de 10 horas con un 50 % de magnetita. Por otro lado, las propiedades magnéticas de este tipo de ferrita dependen fuertemente del tamaño de partícula. Según estudios realizados por Kumar *et al.*, 2015, encontraron que cuando las partículas de Fe_3O_4 se reducen a escala nanométrica, sus propiedades magnéticas decaen: la magnetización de saturación (M_s), la remanencia magnética (B_r) y la fuerza coercitiva (H_c) disminuyen drásticamente y, en consecuencia, las nanopartículas exhiben un comportamiento denominado superparamagnético¹⁸. Por tanto, en esta investigación, se obtuvieron tamaños entre 11,22 y 15,69 nm, dando valores de magnetización entre 38,15 y 52,41 Emu/g, como se muestra en la tabla 5 y figura 8 (a), (b) y (d), y comparado con lo obtenido en el artículo reportado por Puca *et al.*, 2013 se reportaron magnetizaciones de un valor 31,82 emu/g para un diámetro de partícula promedio de 9 nm¹⁹.

Tabla 5. Magnetización del nanocompuesto de grafeno multicapa-magnetita.

Código	Diseño factorial [tiempo(h)][RMG]	Tiempo de sonificación del grafito (h)	Relación másica Magnetita/Grafeno (RMG)	Diámetro de magnetita (nm)	Magnetización Emu/g
MA	(-) (-)	5	40/60	12,46	39,47
MB	(-) (+)	5	60/40	12,13	38,15
ME	(+) (+)	15	60/40	11,22	46,79
MD	(+) (-)	15	40/60	15,69	38,99
MC	(0) (0)	10	50/50	11,74	52,41
MC	(0) (0)	10	50/50	11,74	52,00

Según el trabajo reportado por Peña-Rodríguez *et al.*, 2018 evidenciaron un incremento lineal de la magnetización de saturación y del momento magnético en función de la cantidad de magnetita adicionada a la matriz polimérica²⁰. Sin embargo, en el presente trabajo de investigación no se obtuvo un incremento de la magnetización al aumentar la concentración de magnetita en la relación másica de magnetita/grafeno y esto se atribuye a que el grafeno se ha magnetizado, es decir que, al formarse la magnetita, este le ha dotado al grafeno de magnetización. Así, el resultado fue una nanolamina imantada basada en grafeno. Por tanto, el material obtenido abre la posibilidad de que el grafeno tenga propiedades magnéticas.

**Figura 8.** Espectro Raman de las nanopartículas de grafito-magnetita (RM = 50/50) con un tiempo de agitación por ultrasonido de 10 h.

En la figura 9, se muestran las imágenes tomadas en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) con un voltaje de 15 kV y a diferentes magnificaciones entre 1000x y 10224x, de la superficie de las partículas de grafito y/o grafeno multicapa magnetizado, en donde se aprecian partículas de magnetita con morfología esferoidal en todos los casos, como lo observado en el trabajo reportado por Puca *et al.*, (2013)¹⁹, por lo que se demuestra que las partículas de magnetita han sido estabilizadas por la presencia del tensoactivo SDS, y que la presencia del grafito durante la reacción de precipitación con FeCl_3 y FeCl_2 en medio básico con NH_4OH , no ha afectado la morfología de la magnetita. También se aprecia, en las imágenes, la formación de plaquetas de grafito y nanoescamas de grafeno multicapa intercaladas en la matriz de magnetita, como se observó en el trabajo reportado por Sun *et al.*, (2019)²¹. Las nanoláminas de grafeno se muestran en la imagen de MB y ME, aunque las láminas de grafeno observadas, no son muy delgadas, posiblemente por la formación de multicapas, así también se aprecian entre estas láminas a las nanopartículas de magnetita de forma esferoidal.

En la Figura 9, se observan en todas las muestras las aglomeraciones entre partículas que han sido atribuidas a interacciones magneto-dipolo entre las mismas, debido a que las láminas de grafeno multicapas están rodeados por las cargas introducidas por las moléculas remanentes del tensoactivo.

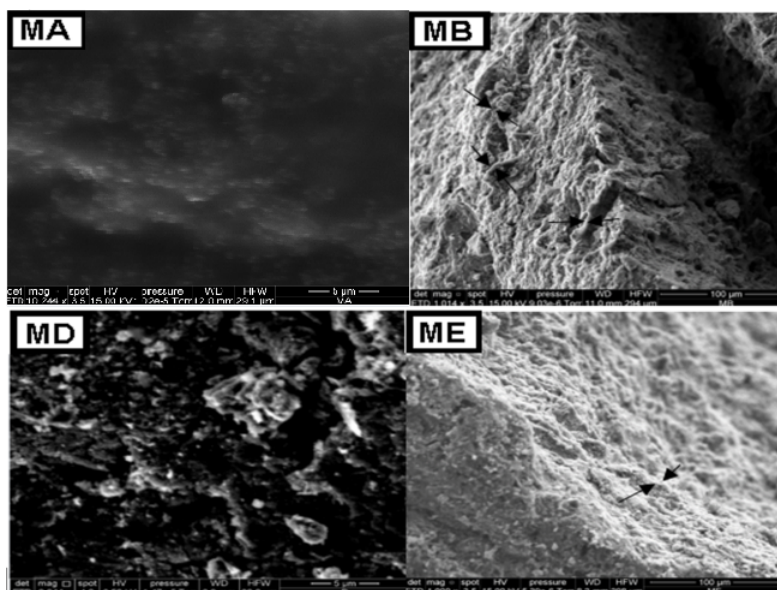


Figura 9. Imágenes obtenidas en el SEM, de las partículas de grafeno multicapa magnetizado: a) muestra MA; b) muestra MB; c) muestra MD y d) muestra ME

En la tabla 6, se muestran los resultados de magnetización y diámetro de las partículas de magnetita obtenidas de acuerdo al diseño factorial 22 con un punto central, teniendo en cuenta las variables independientes: Diámetro de partícula del grafito y la relación másica de magnetita/grafeno (RMG).

Tabla 6. Magnetización del nanocompuestos de grafeno multicapa-magnetita.

Código	Diseño factorial [Dp (nm)][RMG]	Dp grafito Ultrasonido (nm)	[RMG]	Dp magnetita (nm)	Magnetización Emu/g
MA	(+) (-)	243,6	40/60	12,46	39,47
MB	(+) (+)	243,6	60/40	12,13	38,15
ME	(-) (+)	206,7	60/40	11,22	46,79
MD	(-) (-)	206,7	40/60	15,69	38,99
MC	(0) (0)	226,9	50/50	11,74	52,41
MC	(0) (0)	226,0	50/50	11,75	52,00

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk (prueba de normalidad) para los resultados de magnetización y diámetro de partícula de la magnetita y se obtuvieron valores de p-valor = 0,097 y 0,496, respectivamente, y siendo en ambos casos valores mayores que $\alpha = 0,05$. Por lo tanto, cumplen la prueba de normalidad.

La tabla 7, muestra el análisis de varianza para el diámetro de partícula de la magnetita y se aprecia que hay efecto significativo de la relación másica de magnetita/grafeno (RMG) (p-valor = 0,002), así como del diámetro de partícula del grafito (p-valor = 0,004) y existe interacción entre las variables independientes (p-valor = 0,002) sobre el diámetro de partícula de la magnética, ya que sus p-valores son menores que $\alpha = 0,05$, a un nivel de confianza del 95 %.

También, en la tabla 7, se muestra el análisis de varianza para la magnetización y se aprecia que no hay efecto del diámetro de partícula del grafito (p-valor = 0,045), ni de la relación másica de magnetita/grafeno (p-valor = 0,057), ya que sus p-valores son mayores que $\alpha = 0,05$, a un nivel de confianza del 95 %. Sin embargo, existe interacción de ambos factores (diámetro del grafito y relación másica de magnetita/grafeno) sobre la magnetización, ya que el valor-P es menor que $\alpha = 0,05$.

Tabla 7. Análisis de varianza para el diámetro de magnetita y la magnetización

Diámetro de magnetita (nm):	
Efectos principales	
A: Dp grafito ultrasonido(nm)	0,004
B: RMG	0,002
AB	0,002
Magnetización Emu/g:	
Efectos principales	
A: Dp grafito ultrasonido (nm)	0,045
B: RMG	0,057
AB	0,040

*Prueba estadística.

CONCLUSIONES

El grafeno presenta extraordinarias propiedades mecánicas y electrónicas, pero no magnéticas. Sin embargo, la síntesis de la magnetita por coprecipitación *in situ* en la dispersión de grafito sonificado, permitió la separación de las láminas de grafito, para obtener nanoláminas de grafeno dotado de propiedades magnéticas.

Mediante el análisis estadístico se comprobó que, al variar la relación másica de grafeno/magnetita en el nanocompuesto, no afecta la magnetización, lográndose obtener un valor máximo de 52,21 emu/g cuando la relación másica de grafeno y magnetita es de 1:1 y ello se debe a que mediante el proceso de obtención se le ha dotado al grafeno con propiedades magnéticas.

Los nanocompuestos de grafeno/magnetita sintetizados fueron estables y fueron sintetizados a partir de láminas de grafeno 3D obtenido por sonificación, dando la posibilidad de ser escalados a nivel industrial, ya que es un proceso barato y se evita la contaminación de grafeno por los reactivos empleados.

REFERENCIAS

1. Geim A, Kim P. Carbon Wonderland. *Sci Am.* 2008; 298(4):90-97.
2. Balandin A, Ghosh S, Bao W, Calizo, Teweldebrhan D, Miao F, Lau C.N. Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene. *Nano Lett.* 2008; 8: 902-907.
3. Lonkar SP, Deshmukh YS, Abdala AA. Recent advances in chemical modifications of grapheme. *Nano Res.* 2015; 8: 1039–1074.
4. Geim AK. Graphene: status and prospects. *Science.* 2009; 324: 1530-1534.
5. Zhang J, Zhao F, Zhang ZP, Chen N, Qu LT. Dimension-tailored functional graphene structures for energy conversion and storage. *Nanoscale.* 2013; 5: 3112–3126.

6. Liu JQ, Cui L, Losic D. Graphene and graphene oxide as a new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater.* 2013; 9: 9243–9257.
7. Kuila T, Bose S, Khanra P, Mishra AK, Kim NH, Lee JH. Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2011; 26: 4637–4648.
8. Du JH, Cheng HM. The fabrication, properties, and uses of graphene/polymer composites. *Macromol. Chem Phys.* 2012; 213: 1060–1077.
9. Iwan A, Chuchmala A. Perspectives of applied graphene: polymer solar cells. *Prog Polym Sci.* 2012; 37: 1805–1828.
10. Maiti UN, Lim J, Lee KE, Lee WJ, Kim SO. Three-dimensional shape engineered, interfacial gelation of reduced graphene oxide for high rate, large capacity supercapacitors. *Adv Mater.* 2014; 26: 615–619.
11. Wang C, Han X, Xu P, Zhang X, Du Y, Hu S, et al. The electromagnetic property of chemically reduced graphene oxide and its application as microwave absorbing material. *Appl Phys Lett.* 2011; 98:072906. doi: 10.1063/1.3555436
12. Paton KR, Varrla E, Backes C, Smith RJ, Khan U, O'Neill A, et al. Scalable production of large quantities of defect-free few-layer graphene by shear exfoliation in liquids. *Nat Mater.* 2014;13(6):624-630.
13. Bourlinos AB, Georgakilas V, Zboril R, Steriotis TA, Stubos AK. Liquid-phase exfoliation of graphite towards solubilized graphenes. *Small.* 2009; 5: 1841-1845.
14. Hernandez Y, Nicolosi V, Lotya M, Blighe FM, Sun Z, De S, et al. High-yield production of graphene by liquid-phase exfoliation of graphite. *Nat Nanotechnol.* 2008; 3: 563-568.
15. De S, King PJ, Lotya M, O'Neill A, Doherty EM, Hernandez Y, et al. Flexible, Transparent, Conducting Films of Randomly Stacked Graphene from Surfactant-Stabilized, Oxide-Free Graphene Dispersions. *Small.* 2010; 6(3), 458-464.
16. Cullity B. D. *Elements of X-ray Diffraction.* London: Prentice-Hall International; 2000.
17. Ferrari AC. Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron-phonon coupling, doping and nonadiabatic effects. *Sol. Stat. Commun.* 2007; 143, 47-57.
18. Kumar R, Sakthivel R, Behura R, Mishra BK, Das D. Synthesis of magnetite nanoparticles from mineral waste. *J Alloys Compd.* 2015; 645: 398–404.
19. Puca M, Guerrero M, Tacuri E, López RG. Síntesis y caracterización de nanopartículas superparamagnéticas obtenidas por precipitación en microemulsión inversa para aplicaciones biomédica. *Rev Soc Quím Perú.* 2013; 79 (2): 99-106
20. Peña G, Rivera PA, González CH, Parra CA, Garzón AO, Landínez DA, et al. Efecto de la concentración de magnetita en la estructura, propiedades eléctricas y magnéticas de un material compuesto a base de resina de poliéster. *Tecnologías.* 2018; 41 (21): 13-27
21. Sun Q, Liu J, Cheng H, Mou Y, Liu J, Peng Y, et al. Fabrication of 3D structures via direct ink writing of kaolin/grapheme oxide composite suspensions at ambient temperature. *Ceram Int.* 2019; 45(15): 18972-18979.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS COPOLÍMEROS DE INJERTO TERMOSENSIBLES A PARTIR DE N-ISOPROPILACRILAMIDA Y MACROMONÓMEROS DE 2-METIL-2-OXAZOLINA

Ana María Paola Palacios^a, Juan Carlos Rueda^{a*}

RESUMEN

Fueron sintetizados nuevos copolímeros injertados a partir de la polimerización por radicales libres de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) y macromonómeros de 2-metil-2-oxazolina (MM) iniciada por el 2,2'-azobisisobutironitrilo en dimetilformamida. Los macromonómeros, de grados de polimerización 31 y 62, fueron sintetizados mediante la polimerización catiónica por apertura de anillo de 2-metil-2-oxazolina iniciada por el clorometilestireno en presencia de yoduro de sodio. Los macromonómeros y copolímeros injertados fueron caracterizados por espectrometría de resonancia magnética nuclear de protones (¹H-RMN) y la temperatura de transición conformacional fue determinada mediante mediciones turbidimétricas y espectroscopía ¹H-RMN.

La razón molar NIPAAm/MM en el copolímero, determinada por ¹H-RMN, fue mayor que en la alimentación al reactor debido a la mayor reactividad del NIPAAm por su mayor difusividad en el medio reaccionante debido a su menor peso molecular. La temperatura de transición conformacional (LCST) de los copolímeros injertados estuvo en el rango de 33 a 38 °C y la intensidad de la misma fue función de la razón molar de NIPAAm/macromonómero dentro del copolímero injertado. Se incrementó el valor de la LCST, y al mismo tiempo disminuyó su intensidad, al disminuir la razón molar NIPAAm/MM en el copolímero. La LCST también disminuyó aún más en intensidad al aumentar el grado de polimerización del macromonómero. A partir de la temperatura LCST, los copolímeros injertados con un relativamente alto contenido de MM podrían formar micelas o agregados moleculares tipo “core-shell” en solución acuosa, que estarían formados por un núcleo con segmentos colapsados de poliNIPAAm y una corona formada de cadenas hidrofílicas de polimetiloxazolina, las cuales impiden parcialmente un colapso intermolecular de estos agregados.

Palabras clave: Copolímero de injerto, NIPAAm, termosensibilidad, macromonómero, polioxazolinas.

^a Laboratorio de Polímeros, Sección Física, DGI, Pontificia Universidad Católica del Perú, Av. Universitaria 1801, San Miguel, Lima, Perú, jrueda@pucp.edu.pe

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NEW THERMOSENSITIVE GRAFT COPOLYMERS FROM N-ISOPROPYLACRYLAMIDE AND 2-METHYL-2-OXAZOLINE MACROMONOMERS

ABSTRACT

New graft copolymers were synthesized from the free radical polymerization of N-isopropylacrylamide (NIPAAm) and 2-methyl-2-oxazoline (MM) macromonomers initiated by 2,2'-azobisisobutyronitrile in dimethylformamide. The macromonomers, with polymerization degrees 31 and 62, were synthesized by ring-opening cationic polymerization of 2-methyl-2-oxazoline initiated by chloromethylstyrene in the presence of sodium iodide. The grafted macromonomers and copolymers were characterized by proton nuclear magnetic resonance spectrometry ($^1\text{H-RMN}$) and the conformational transition temperature was determined by turbidimetric measurements and $^1\text{H-RMN}$ spectroscopy. The NIPAAm / MM molar ratio in the copolymer, determined by $^1\text{H-RMN}$, was higher than in the feed to the reactor due to the higher reactivity of the NIPAAm due to its greater diffusivity in the reacting medium due to its lower molecular weight. The conformational transition temperature (LCST) of the graft copolymers ranged from 33 to 38 °C and the intensity of the same was a function of the molar ratio of NIPAAm / macromonomer within the graft copolymer. The value of the LCST increased, and at the same time its intensity decreased, as the NIPAAm / MM molar ratio decreased in the copolymer. The LCST also decreased even more in intensity as the degree of polymerization of the macromonomer increased. From the LCST temperature, the graft copolymers with a relatively high content of MM could form micelles or molecular aggregates type "core-shell" in aqueous solution, which would be formed by a core with collapsed segments of polyNIPAAm and a shell formed of hydrophilic polymethyloxazoline chains, which partially prevent an intermolecular collapse of these aggregates.

Key words: Graft copolymers, NIPAAm, thermoresponsive, macromonomer, polyoxazolines.

INTRODUCCIÓN

El campo de los "smart" polímeros o polímeros inteligentes ha despertado un gran interés tecnológico debido a la variedad de aplicaciones en las que se pueden utilizar estos materiales ya que son capaces de responder de forma reversible a estímulos externos como, por ejemplo, temperatura, pH, luz, campo magnético y eléctrico.^{1,2} Las principales aplicaciones de estos polímeros se encuentran en campos como liberación controlada de medicamentos, inmovilización de proteínas y enzimas, sensores y actuadores, óptica, entre otros^{2,3}.

Uno de los monómeros más utilizados para fabricar polímeros inteligentes ("smart polymers") sensibles a la temperatura es la N-isopropilacrilamida (NIPAAm)^{4,5}. Cuando el poliNIPAAm se disuelve en agua, tiene una temperatura de transición conformacional (Lower Critical

Solution Temperature - LCST) de 32 °C, que debido a su cercanía a la temperatura del cuerpo humano, podría utilizarse para elaborar biomateriales inteligentes^{3,4}. A temperaturas superiores al LCST, los segmentos poliméricos de poliNIPAAm pasan de ser hidrofílicos a hidrofóbicos y entonces comienzan a interactuar entre sí de una manera más intensa que con el agua y esto lleva a la precipitación o dispersión del polímero en el medio acuoso⁴. La LCST del poliNIPAAm puede disminuir o aumentar, cuando el NIPAAm es copolimerizado con comonómeros hidrofóbicos o hidrofílicos, respectivamente^{5,7}. La LCST también se puede incrementar adicionando a la solución acuosa de poliNIPAAm sales inorgánicas o surfactantes. Las propiedades de estos polímeros y su aplicabilidad están determinadas, también, por las funciones químicas del comonómero del NIPAAm y el peso molecular del polímero⁷.

La síntesis de copolímeros estadísticos a partir de NIPAAm y acrilato de sodio produce un aumento del LCST del poliNIPAAm debido a la fuerte polaridad del acrilato de sodio y, adicionalmente, se obtiene sensibilidad al pH debido a la función química carboxilato de este monómero^{6,7}. Sin embargo, una distribución aleatoria de unidades del acrilato de sodio dentro de la cadena de poliNIPAAm no permite obtener una fuerte intensidad de la respuesta térmica ni mantener la temperatura de transición LCST cercana a la temperatura del cuerpo humano⁷. Una posible solución a este problema podría ser que los grupos ácidos no estén en la cadena principal del PoliNIPAAm sino en cadenas laterales y esto se podría lograr copolimerizando el NIPAAm con macromonómeros que contengan grupos ácidos^{8,9}. Los macromonómeros de poli(2-oxazolona), conteniendo grupos ácidos, podrían ser adecuados para lograr esta separación de fases y también pueden darles nuevas propiedades a los copolímeros injertados porque los grupos ácido pueden ser modificados posteriormente a diversas funciones químicas tales como aminas, tioles^{9,10}.

La síntesis de poli(2-oxazolona) mediante polimerización catiónica de apertura de anillo ocurre en una forma “viva”, o sea sin reacciones de interferencia (reacciones de terminación o de transferencia de cadena), por lo que el peso molecular y la funcionalidad de estos polímeros pueden controlarse con gran eficiencia permitiendo, por ejemplo, la introducción de grupos vinilo al inicio o al final de la cadena polimérica⁸⁻¹³. Se ha determinado que en la polimerización de este tipo de monómeros ocurre una transferencia de cadena solo para razones molares iniciales de monómero/iniciador mayores a 350¹²⁻¹⁴.

Anteriormente, nuestro grupo de investigación sintetizó copolímeros injertados de NIPAAm y 2-oxazolinas mediante el método “grafting from”, y se obtuvieron copolímeros con un valor relativamente alto del grado de polimerización de las cadenas laterales^{15, 16, 18}.

En este trabajo se presenta la síntesis, mediante el método del macromonómero, de copolímeros injertados termosensibles a partir de PNIPAAm y macromonómeros de 2-metil-2-oxazolona.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y equipos

Se purificó N-isopropilacrilamida (NIPAAm) (Aldrich) mediante su recristalización en etanol absoluto y se secó al vacío. Se sintetizó 2-metil-2-oxazolina (MeOxa) mediante el método descrito en la literatura¹⁷ y se secó mediante destilación sobre hidruro de calcio. El clorometilestireno (CMS) (Aldrich, mezcla de isómeros *meta* (70 % molar) y *para* (30 % molar) se purificó mediante destilación fraccionada antes de su uso. Se recristalizó 2,2'-azobis (isobutironitrilo) (AIBN) en metanol. El éter dietílico, el cloroformo y el metanol se destilaron antes de su uso. Se utilizó acetonitrilo anhidro (Merck), yoduro de sodio y nitrógeno, todos de alta pureza y fueron usados tal como recibidos. El poliNIPAAm (Aldrich) de peso molecular 20000 (Aldrich) se usó como fue recibido. El agua utilizada para todas las mediciones fue purificada y desionizada en un sistema de purificación Millipore Milli-Q. Todos los demás solventes y productos químicos fueron usados tal como fueron recibidos.

Las mediciones de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron llevadas a cabo en un equipo Bruker Advance III 500 Spectrometer, operando a 500,13 MHz para ¹H. Como solventes se utilizaron agua y metanol deuterados y como estándar interno se usó el tetrametilsilano (TMS).

Las mediciones de turbidimetría fueron realizadas en el equipo UV/Vis Thermo Fisher Scientific Helios Gamma. El baño termostático Fischerbrand Modelo FBH-604 fue usado para variar la temperatura de la solución polimérica en los análisis turbidimétricos.

Procedimiento experimental

Síntesis del macromonomero de 2-metil-2-oxazolina (MM)

Los macromonomeros (MM) se sintetizaron mediante la copolimerización catiónica por apertura de anillo de 2-metil-2-oxazolina (MeOXA) iniciada por el clorometilestireno (CMS) en presencia de yoduro de sodio de acuerdo con el método descrito en la literatura⁹⁻¹¹.

Procedimiento (MM-1): En un reactor de 100 mL, se mezclaron, bajo corriente de nitrógeno seco, 7,19 g (84,4 mmol) de MeOXA, 0,84 g (5,6 mmol) de NaI y 0,43 g (2,81 mmol) de CMS en 25 ml de acetonitrilo anhidro. Esta mezcla se calentó a 78 °C, bajo atmósfera de nitrógeno, durante 7 horas. Al final de este periodo se enfrió el sistema y se agregó una solución de 0,3 g de hidróxido de potasio en 2 mL de metanol. Posteriormente, la solución fue filtrada para eliminar las sales y se obtuvo el polímero mediante precipitación en éter dietílico. Se obtuvo 7,34 g de macromonomero MM-1 con un rendimiento del 97 %. El MM-2 fue sintetizado en forma similar a MM-1 y se usó 2,11 mmol de CMS y 137,2 mmol de MeOXA en el caso de MM-2.

¹H RMN (CD₃OD) δ (ppm): 2,0-2,2 (NC(O)CH₃), 3,4-3,8 (NCH₂CH₂), 5,2-5,3 y 5,7-5,9 (=CH₂), 6,7-6,9 (=CH-), 7,1-7,5 (H_{arom}).

Mediante el análisis cuantitativo del espectro de $^1\text{H-RMN}$, se determinó que los grados de polimerización (DP) de MM-1 y MM-2 fueron 31 y 62, respectivamente. Así, los pesos moleculares de los macromonómeros MM-1 y MM-2, determinados mediante RMN, fueron 2770 y 5410 g/mol, respectivamente.

Síntesis de copolímeros injertados (CI)

Procedimiento (CI-2): En un balón de 100 ml y con entrada lateral de nitrógeno seco, fueron disueltos, en 8 ml de dimetilformamida (DMF), 1,03 g de MM-1 (0,37 mmol), 1,26 g de NIPAAm (11,16 mmol) y 0,048 g de AIBN (0,29 mmol). Se burbujeó nitrógeno durante 10 minutos en la mezcla de reacción. El sistema fue cerrado y se calentó a 70 °C durante 24 horas, bajo agitación constante. Al término de este periodo, el sistema fue enfriado y adicionado al sistema de reacción 20 ml de una mezcla de dioxano y cloroformo (v:v 50/50). Luego el polímero fue obtenido mediante precipitación en 400 mL de éter dietílico. Finalmente, el polímero fue secado y guardado en un desecador. Se obtuvo 1,90 g de polímero injertado (rendimiento: 82 %). Los demás copolímeros injertados se sintetizaron en forma similar.

El polímero fue caracterizado por $^1\text{H-RMN}$ para confirmar su estructura y obtener la relación molar de NIPAAm/MM en el mismo.

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm): 1,15 (CH_3 , NIPAAm); 1,3-1,9 (CH_2CH , NIPAAm, MM-1); 2,0-2,2 (CH_3 , MM-1); 3,4-3,7 (NCH_2CH_2 , MM-1), 4,0 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 6,8-7,3 (NH); 7,5-8,2 (H_{ar}).

Determinación de la temperatura de transición conformacional (LCST) de los copolímeros injertados

La determinación de la temperatura de transición conformacional (LCST) de los copolímeros injertados se realizó mediante el método turbidimétrico.

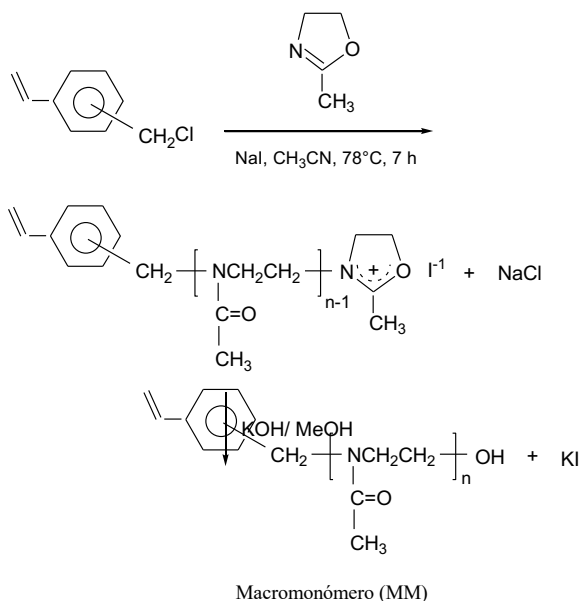
Procedimiento: se pesaron 0,040 g. de polímero injertado y se disolvieron en 4,0 ml de agua destilada (pH = 5,7), de modo que la concentración en peso del polímero fuese 1 %. Luego, se filtró la solución polimérica y se colocó en una cubeta de un espectrómetro UV/Vis. También, se colocó una termocupla flexible dentro de la cubeta, de tal manera que se pudiera medir en todo momento la temperatura de la solución polimérica contenida en la misma. Se calentó gradualmente la solución acuosa y se procedió a medir con el espectrómetro UV/Vis el porcentaje de transmitancia de la solución acuosa versus la temperatura de la misma a una longitud de onda de 500 nm. A partir de un cierto valor de temperatura el valor de transmitancia comenzó a disminuir debido a la precipitación o dispersión del polímero en la fase acuosa. Los valores del porcentaje de transmitancia fueron graficados en función de la temperatura y se obtuvo una curva. Se tomó como el valor de la temperatura de transición (LCST) el punto de inflexión de la curva^{4,7}.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de los macromonómeros de poli (2-oxazolina) (MM)

Los macromonómeros (MM) se sintetizaron mediante la polimerización catiónica por apertura de anillo (PCAA) de 2-metil-2-oxazolina (MeOxa) iniciada por el clorometilbenceno (CMS) en acetonitrilo (esquema 1). Se añadió yoduro de sodio al sistema de polimerización para coincidir la reacción mediante el intercambio de halógeno. El grupo vinilo fue introducido por el iniciador CMS (método del “iniciador”)⁹. Para evitar la polimerización prematura del grupo vinilo, se utilizó una concentración relativamente baja de CMS (0,136 M), una baja temperatura de reacción de 78 °C y un corto tiempo de reacción de 7 h⁹-¹¹. La polimerización se terminó con una solución de KOH en metanol introduciendo así un grupo OH en el final de cadena. Los rendimientos de las reacciones de síntesis de los macromonómeros fueron mayores al 94 %. Los detalles experimentales y resultados obtenidos se resumen en la tabla 1.

La polimerización PCAA de las 2-oxazolininas ocurre vía polimerización “viva”, esto quiere decir que solo ocurren las reacciones de iniciación y propagación sin que ocurran reacciones de interferencia (reacción de terminación o de transferencia de cadena). Por esta razón, es posible sintetizar los macromonómeros MM-1 y MM-2 con grados de polimerización predeterminados (tabla 1).



Esquema 1. Síntesis del macromonómero de 2-metil-2-oxazolina.

Tabla 1. Síntesis de los macromonómeros. Condiciones de reacción y resultados.

MM ^a	CMS ^b (mmol)	MeOxa ^c (mmol)	NaI ^d (mmol)	MeOXA/CMS ^e	MeOXA/CMS ^f	R ^g (%)
MM-1	2,81	84,44	5,63	30	31	97
MM-2	2,11	137,20	4,22	65	62	95

^a) Denominación del macromonómero, ^b) Clorometilestireno, ^c) 2-Metil-2-oxazolona, ^d) Ioduro de sodio, ^e) Relación molar inicial de metiloxazolona y clorometilestireno en la alimentación al reactor ^f) Relación molar de metiloxazolona y clorometilestireno en el macromonómero determinada mediante el espectro ¹H-RMN, ^g) Rendimiento de la polimerización, que es igual a la relación entre el peso de macromonómero obtenido versus la suma del peso inicial de iniciador (CMS) y monómero (MeOxa).

Los macromonómeros fueron solubles en agua, metanol y cloroformo. La estructura molecular de los macromonómeros (MM) fue confirmada mediante espectroscopía ¹H-RMN (ej. MM-1 en figura 1).

El grado de polimerización de los macromonómeros se determinó a partir de la comparación entre la integral de la señal del grupo metilo “f” de MeOxa (2,1 ppm) versus las señales “a, á, b y c” del grupo de partida estirilo (figura 1). Los grados de polimerización de MM-1 y MM-2, así determinados por RMN, fueron de 31 ($Mn_{RMN} = 2770$) y 62 ($Mn_{RMN} = 5410$) para MM-1 y MM-2, respectivamente. Estos valores están en excelente concordancia con los valores de la razón molar inicial macromonómero/iniciador de 30 y 65 para MM-1 y MM-2, respectivamente (tabla 1). Este resultado evidenció que ocurrió una polimerización de tipo “viva” de la MeOXA.

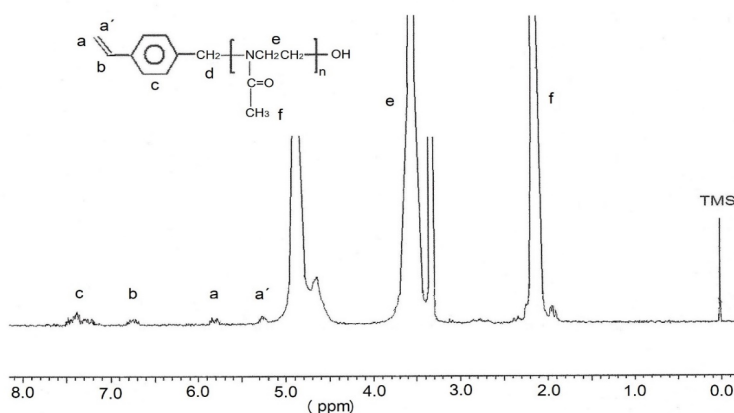


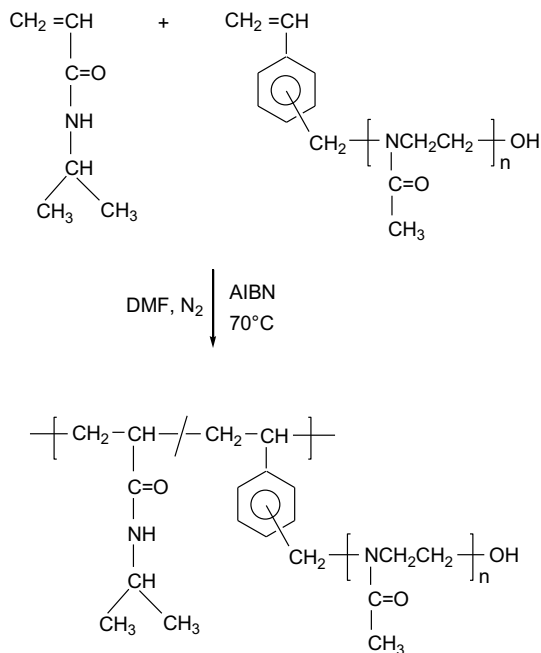
Figura 1. Espectro ¹H-RMN del macromonómero MM-1 en CD₃OD a 25°C. Las señales del espectro han sido asignadas a la estructura del polímero. Las señales en 3,3 y 4,9 ppm corresponden a las señales del metanol deuterado

El mecanismo de polimerización puede ser descrito de la siguiente manera⁹: En la reacción de iniciación ocurre un intercambio entre el átomo de cloro del clorometilestireno y el átomo de yodo del yoduro de sodio y de esta manera se genera el grupo funcional yoduro de bencilo, el cual es un grupo más eficiente que el cloruro de bencilo para iniciar la polimerización de la 2-metil-2-oxazolina debido al mejor desarrollo del carbocatión bencílico por la menor afinidad electrónica del átomo de yodo^{9, 11}. Posteriormente, la molécula de 2-metil-2-oxazolina ataca nucleofílicamente al carbocatión bencílico produciéndose el primer catión oxazolínico. Luego, este catión oxazolínico es atacado por nuevas moléculas de 2-metil-2-oxazolina produciéndose, así, la propagación de la polimerización. Para terminar la reacción se hace reaccionar el catión oxazolínico propagante con el hidróxido de potasio y se introduce al final de la cadena el grupo hidroxilo. De esta forma, se obtiene un macromonomero de 2-metil-2-oxazolina de relativamente bajo peso molecular, el cual contiene un grupo vinilo al inicio de la cadena polimérica.

Síntesis de copolímeros injertados mediante el método del macromonomero

Fueron sintetizados nuevos copolímeros injertados mediante la polimerización por radicales libres de N-isopropilacrilamida y los macromonomeros de 2-metil-2-oxazolina (MM-1 y MM-2) (esquema 2). La polimerización fue iniciada por el 2,2'-azoisobutironitrilo y llevada a cabo a 70 °C en dimetilformamida. Se obtuvieron copolímeros injertados de tipo estadístico ya que se alimentó la mezcla de monómeros al inicio de la reacción. El rendimiento de la polimerización estuvo entre 48 y 94 %. En la tabla 2 se muestran los detalles experimentales y resultados obtenidos.

La estructura química de los copolímeros fue confirmada por sus espectros ¹H-RMN (ejemplo CI-2 en figura 2). El contenido relativo de los comonomeros en el copolímero fue determinado a partir del análisis cuantitativo del espectro ¹H-RMN mediante la comparación de la integral de la señal “i” del metino (CH) del grupo isopropilo del NIPAAm y de la señal “h” de los grupos metilenos (NCH₂CH₂) del macromonomero.



Esquema 2. Síntesis de los copolímeros injertados a partir de NIPAAm y macromonómero de 2-metil-2-oxazolina.

Se determinó que la relación molar NIPAAm/MM en el copolímero fue, en todos los casos, mayor a la relación molar inicial de estos comonómeros y fue aún mayor en el caso de MM-2 (tabla 2). Esto indica que el NIPAAm se incorporó en mayor cantidad que los macromonómeros (MM-1 o MM-2) en el copolímero. Este resultado era esperado ya que el monómero NIPAAm, por ser una molécula de bajo peso molecular, tiene una mayor velocidad de difusión que el macromonómero, que es un polímero, y por esta razón el NIPAAm puede reaccionar más fácilmente con la especie propagante radicalaria y se incorporaría en mayor cantidad en el copolímero. En la literatura no existen valores para las razones de reactividad de este nuevo sistema de copolimerización pero en un sistema similar que consiste de estireno (M_1) y *N,N*-dietilacrilamida (M_2), los valores de reactividad son $r_1 = 1,23$ y $r_2 = 0,39$, respectivamente^{18, 19}. Llevando estos datos al presente caso, eso indicaría que el grupo estirilo del macromonómero tendría una mayor reactividad que el NIPAAm y así, por este factor, se favorecería una mayor incorporación de MM en el copolímero en el inicio de la polimerización. Sin embargo, debido a la baja difusibilidad del MM, por su peso molecular relativamente alto en comparación al NIPAAm, al final se incorporaría de preferencia el NIPAA en el copolímero, debido a su bajo peso molecular y por consiguiente mayor difusibilidad en el medio reaccionante. Este último factor es lo que al final predomina en la copolimerización.

El peso molecular de los copolímeros injertados y macromonómeros no fue determinada por cromatografía de permeación en gel (GPC) debido a que, generalmente, con polímeros anfífilicos, como es este caso, ya fue demostrado en la literatura que se producen resultados inesperados, por ejemplo, se obtiene un muy bajo peso molecular y una muy ancha distribución del peso molecular^{18, 19}. Esto ocurre, probablemente, debido a que, por su carácter anfílico (conteniendo simultáneamente dentro de su estructura partes hidrofóbicas e hidrofílicas), estos polímeros tienden a adherirse a las columnas cromatográficas y estos polímeros también pueden formar micelas o agregados moleculares en la mezcla de solventes del GPC (ejemplo: dimetilformamida /agua/LiCl)^{18, 20}.

Tabla 2. Síntesis de los copolímeros injertados. Condiciones de reacción y resultados.

CI ^a	MM ^b	NIPAAm ^c (mmol)	MM ^d (mmol)	AIBN ^e (mmol)	R1 ^f	R2 ^g	LCST ^h (°C)
CI-1	MM-1	2,78	0,19	0,07	15	17	37,5
CI-2	MM-1	11,16	0,37	0,29	30	35	35
CI-3	MM-1	11,16	0,19	0,29	61	70	34
CI-4	MM-1	15,91	0,19	0,40	84	100	33
CI-5	MM-2	0,37	4,42	0,12	12	16	38
CI-6	MM-2	8,59	0,29	0,22	30	50	35
CI-7	MM-2	11,45	0,19	0,29	60	87	34
CI-8	MM-2	11,45	0,10	0,29	120	ⁱ⁾	33,5

^{a)} Denominación del copolímero injertado, ^{b)} Macromonómero, ^{c)} N-isopropilacrilamida, ^{d)} Macromonómero MM, ^{e)} 2,2'-Azoisobutironitrilo, ^{f)} R1 = Relación molar de NIPAAm/MM en la alimentación al reactor, ^{g)} R2 = Relación molar final de NIPAAm/MM en el copolímero injertado fue determinada mediante el análisis cuantitativo del espectro ¹H-RMN, ^{h)} Temperatura de transición conformacional (LCST) del copolímero injertado, ⁱ⁾ No fue determinado, ^{j)} Los rendimientos de la síntesis de copolímeros injertados fueron de 67, 82, 52, 48, 62, 94, 78, y 69 para CI-1, CI-2, hasta CI-8, respectivamente.

Determinación de la temperatura de transición de los copolímeros injertados

Los copolímeros injertados también fueron caracterizados por su temperatura de transición conformacional (LCST), la cual fue determinada por el método turbidimétrico (espectrómetro UV/Vis) y espectros ¹H-RMN. El método turbidimétrico consistió en la medición del porcentaje de transmitancia de soluciones acuosas de copolímero injertado versus la temperatura. El polímero con una sensibilidad térmica precipita a una determinada temperatura y entonces el porcentaje de transmitancia disminuye.

En estas mediciones se usó como elemento de comparación el poliNIPAAm comercial (Aldrich, peso molecular $M_n = 20000$). El poliNIPAAm “puro” tuvo una transición conformacional aproximadamente a los $31,5\text{ }^\circ\text{C}$ (Lit. $32\text{ }^\circ\text{C}$), en la que cambió drásticamente su característica pasando de ser hidrofílico a hidrofóbico y ocurrió una repentina dispersión del polímero en el agua de tal manera que se interrumpió el paso de la luz y la transmitancia cayó hasta un valor de cero^{4,7} (figuras 3 y 4).

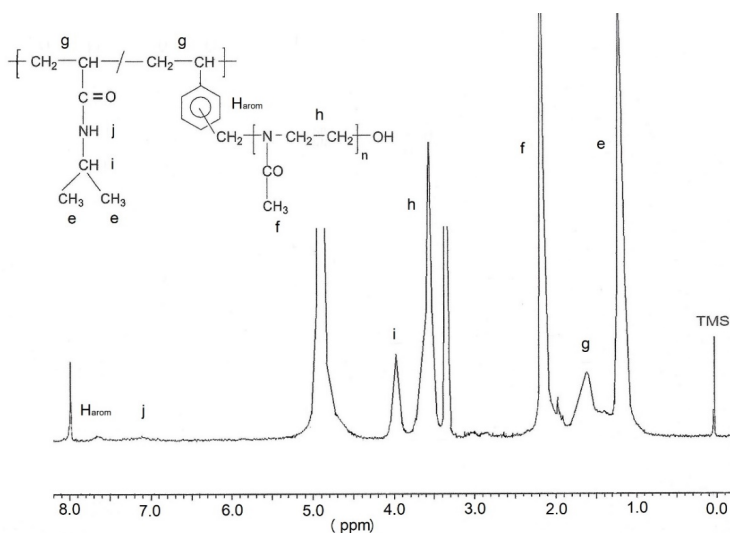


Figura 2. Espectro ^1H -RMN del copolímero injertado CI-2 en metanol deuterado a $25\text{ }^\circ\text{C}$. Las señales del espectro han sido asignadas a la estructura del polímero. Las señales en 3, y 4,9 ppm corresponden a las señales del metanol deuterado.

Respecto a los copolímeros injertados, se observó que la inclusión de los segmentos hidrofílicos de los macromonómeros incrementaron el valor de la LCST y este incremento fue mayor a mayor cantidad de macromonómero y también se determinó que al aumentar el contenido de MM en el copolímero injertado disminuyó la intensidad de la transición conformacional (los valores de transmitancia no llegaron a valores cercanos a cero) y esta disminución de la intensidad de la transición conformacional fue más acentuada cuando el peso molecular del macromonómero fue mayor (comparar, por ejemplo, CI-5 (MM-2) vs CI-1 (MM-1)). Estos resultados experimentales se podrían explicar de la siguiente manera (Zschoche y Rueda^{15, 16, 18}): los segmentos hidrofílicos de polimetiloxolina del macromonómero producen una mayor hidrofiliidad que los segmentos de poliNIPAAm en la cadena principal y, por consiguiente, un corrimiento de la LCST hacia temperaturas más altas. A partir del LCST, los copolímeros con un contenido de poliMeOxa relativamente alto podrían formar micelas o agregados moleculares del tipo “core-shell”, las cuales contendrían un núcleo hidrofóbico de poliNIPAAm colapsado y en el exterior de este núcleo estarían las

cadenas laterales hidrofílicas de poliMeOxa, solvatadas por las moléculas de agua^{16, 18} (esquema 3). Este fenómeno estabilizaría las micelas y parcialmente impediría que ocurra el colapso intermolecular entre las diferentes partículas poliméricas.

En el caso de los macromonómeros MM-1 y MM-2, también se les sometió a las mismas mediciones que los copolímeros injertados, pero no se observó ninguna dispersión del polímero ya que estos polímeros no son sensibles a la temperatura (figuras 3 y 4).

En el caso de los copolímeros injertados CI-1 y CI-5, también se determinó la temperatura de transición conformacional (LCST) mediante los espectros ¹H-RMN. Se obtuvieron los espectros ¹H-RMN de cada copolímero injertado a temperaturas crecientes y se pudo observar que, a una determinada temperatura, ocurrió un decrecimiento de la intensidad de las señales que corresponden a las unidades de NIPAAm contenidas en la cadena principal del copolímero injertado (figura 5). Por ejemplo, la señal ubicada entre 1,0 y 1,3 ppm perteneciente a los dos grupos metilo del NIPAAm no sufrió cambios desde los 25 hasta los 35 °C, aproximadamente. Sin embargo, a partir de esta última temperatura ocurrió una disminución de la intensidad de esta señal, la cual decreció paulatinamente hasta aproximadamente los 60 °C y se estabilizó. Al ocurrir el LCST, los segmentos de poliNIPA contenidos en la cadena principal se aglomeran, colapsan, y son solo parcialmente solvatados por las moléculas de agua, entonces disminuye fuertemente su movilidad, se comportan parcialmente como sólidos, tienen un alto tiempo de relajación en el RMN y entonces son detectados con menos intensidad en el espectro ¹H-RMN. La señal del metilo (“e”) no desaparece totalmente, probablemente debido a que las cadenas laterales de poliMeOXA, fuertemente hidrofílicas, permiten, por su cercanía a las cadenas de poliNIPAAm, una solvatación parcial de estas por las moléculas de agua deuteradas y, por consiguiente, existe todavía una movilidad parcial.

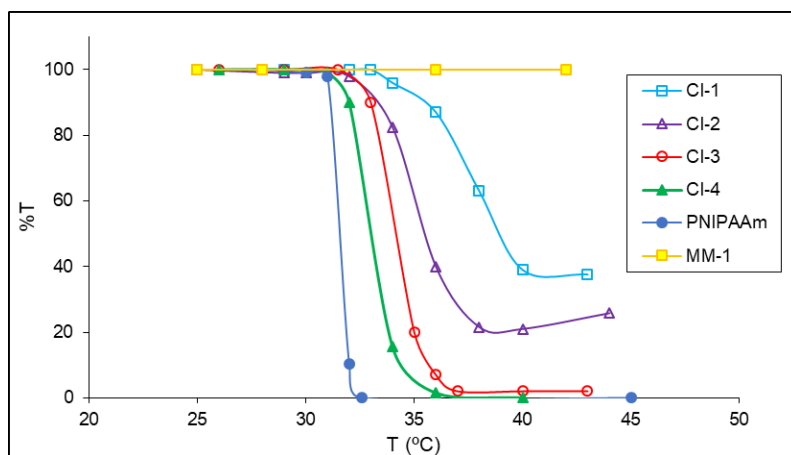


Figura 3. Determinación del LCST de los copolímeros injertados CI-1 - CI-4 mediante el método turbidimétrico. Los valores de LCST fueron 37,5, 35, 34, 33 y 31,5 para CI-1, CI-2, CI-3, CI-4, y PoliNIPAAm, respectivamente. (Gráfica del porcentaje de transmisión (%T) vs temperatura (°C), 500 nm, 1 % en peso de solución polimérica). PoliNIPAAm (Mn = 20000).

Por el contrario, las señales correspondientes a las cadenas de poli(2-metil-2-oxazolina) si son detectadas hasta, relativamente, altas temperaturas como, por ejemplo, 75 °C (figura 5, señales “f” y “h”) debido a que éstas, por su hidrofiliicidad, si son bien solvatadas por las moléculas de agua, aun a temperaturas encima de los 35 °C y entonces tienen movilidad y aparecen en el espectro RMN.

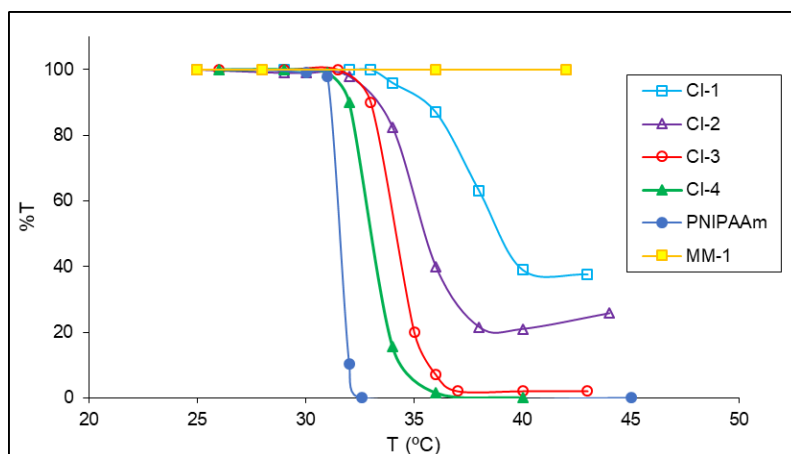
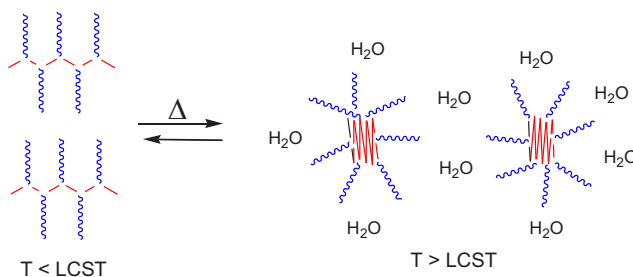


Figura 4. Determinación del LCST de los copolímeros injertados CI-5, CI-6, CI-7, y CI-8 mediante el método turbidimétrico. Los valores de LCST fueron 38, 35, 34, 33,5 y 31,5 para CI-5, CI-6, CI-7, CI-8, y PoliNIPAAm, respectivamente (gráfica del porcentaje de transmisión (%T) vs temperatura (°C), 500 nm, 1 % en peso de solución polimérica). PoliNIPAAm ($M_n = 20000$).



Esquema 3. Modificación conformacional de los copolímeros injertados que contienen una cantidad relativamente alta de cadenas laterales de poliMeOxa (CI-1, CI-2, CI-5, CI-6) respecto a la cadena principal de NIPAAm.

Este comportamiento obtenido en el espectro RMN corrobora los resultados encontrados con el método turbidimétrico y se pueden explicar, cómo fue mencionado líneas arriba, por la formación de micelas o agregados moleculares a temperaturas mayores a 35 °C (esquema 3).

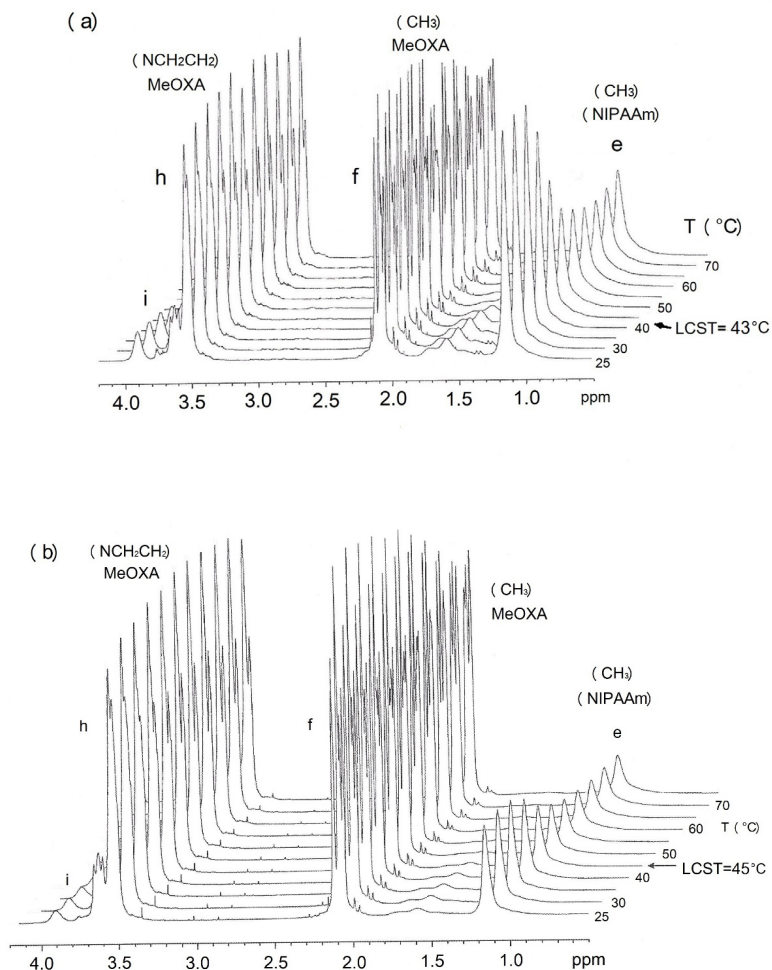


Figura 5. Espectro ^1H -RMN del copolímero injertado CI-2 en metanol deuterado a 25 °C. Las señales del espectro han sido asignadas a la estructura del polímero. Las señales en 3, y 4,9 ppm corresponden a las señales del metanol deuterado.

La corona hidrofílica de poliMeOxa, solvatada por las moléculas de agua, estabiliza y separa unas micelas de otras y esto impide, por lo menos parcialmente, un colapso intermolecular de los polímeros, pero sí ocurre el colapso intramolecular.

Para hallar el valor de la temperatura de transición conformacional se graficó la intensidad de la señal del grupo metilo del NIPAAm versus la temperatura y se obtuvo una curva y se tomó el LCST como el punto de inflexión de la misma (Figura 6, ej. CI-1) Se obtuvo los valores aproximados de LCST de 43 °C y 45 °C para CI-1 y CI-5, respectivamente. Estos valores son

mayores a los obtenidos vía el método turbidimétrico, que son 37,5 y 38 °C para CI-1 y CI-5, respectivamente. Esta diferencia puede deberse a que, en el método RMN, la medición se hizo más rápido que en el método turbidimétrico y entonces el polímero no consiguió llegar a su equilibrio total en cada temperatura.

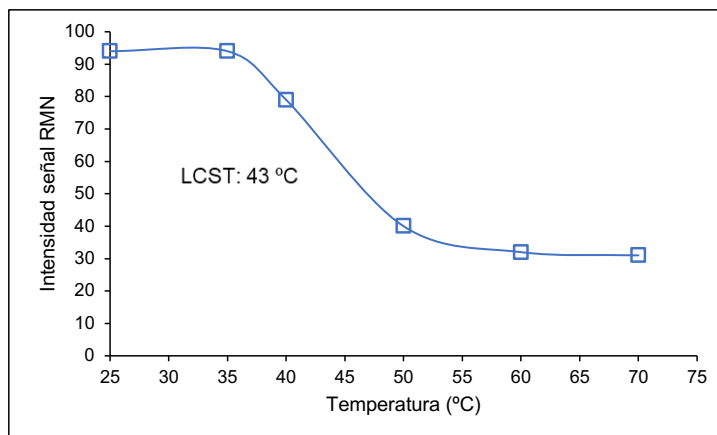


Figura 6. Determinación del LCST del copolímero CI-1 mediante 1H-RMN. Gráfica de la intensidad de la señal RMN del grupo metilo del NIPAAm en función de la temperatura.

CONCLUSIONES

Fueron sintetizados nuevos copolímeros injertados mediante la polimerización por radicales libres de *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm) y macromonómeros de 2-metil-2-oxazolona (MM) iniciada por el 2,2'-azobisisobutironitrilo a 70 °C en dimetilformamida. Los macromonómeros fueron sintetizados mediante la polimerización catiónica por apertura de anillo de 2-metil-2-oxazolona iniciada por el clorometilestireno en presencia de yoduro de sodio a 78 °C en acetonitrilo. Los copolímeros injertados mostraron una transición conformacional (LCST) a una determinada temperatura, la cual fue en función del grado de polimerización del macromonómero y de la variación de la razón molar de NIPAAm/macromonómero dentro del copolímero injertado. La temperatura de transición LCST se incrementó con la disminución de la razón molar NIPAAm/MM en el copolímero y la transición conformacional perdió intensidad al aumentar el porcentaje molar de MM en el copolímero injertado y al aumentar el grado de polimerización del macromonómero. A partir de la temperatura LCST, los copolímeros injertados con un relativamente alto contenido de MM podrían formar micelas o agregados moleculares tipo “core-shell” en solución acuosa que estarían formados por un núcleo hidrofóbico de poliNIPAAm colapsado y una corona formada de cadenas hidrofílicas de polimetiloxazolona solvatadas por las moléculas de agua que impedirían parcialmente un colapso intermolecular de estos agregados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Dirección de Gestión de la Investigación (DGI) de la Pontificia Universidad Católica del Perú por el apoyo financiero para esta investigación y al Dr. Hartmut Komber, del Instituto Leibniz de Investigaciones en Polímeros de Dresden (IPF), Alemania por los análisis de resonancia magnética nuclear (RMN).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Koetting MC, Peters JT, Steichen SD, Peppas NA. Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. *Mater Sci Eng R Rep.* 2015; 93:1-49.
2. Aguilar M, San Roman J. Smart polymers and their applications. Second edition. London, England: Elsevier; 2019.
3. Cohen SA, Huck TS, Genzer J, Muller M, Stamm M. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nat Mater.* 2010; 9:101-113.
4. Schild HG. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog Polym Sci.* 1992; 17: 163-249.
5. Rueda JC, Zschoche S, Komber H, Krahl F, Arndt KF, Voit B, New Thermo-Sensitive Graft Copolymers Based on a Poly(N-isopropylacrylamide) Backbone and Functional Polyoxazoline Grafts with Random and Diblock Structure *Macromol Chem Phys.* 2010; 211: 706-711.
6. Krause AT, Zschoche S, Rohn M, Hempel C, Richter A, Appelhans D, et al. Swelling behavior of bisensitive interpenetrating polymer networks for microfluidic applications. *Soft Matter.* 2016; 12: 5529-5536.
7. Schmaljohann D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(15):1655-70.
8. Pizzi D, Humphries J, Morro J, Fletcher NL, Bell CA, Thurecht KJ, et al. Poly(2-oxazoline) macromonomers as building blocks for functional and biocompatible polymer architectures. *Eur Polym J.* 2019; 121:109258. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109258.
9. Rueda JC, Santillán F, Komber H, Voit B. Synthesis and Characterization of Stiff, Self-Crosslinked Thermoresponsive DMAA Hydrogels. *Polymers.* 2020; 12:1401. doi: 10.3390/polym12061401
10. Rueda JC, Campos E, Komber H, Zschoche S, Haussler L, Voit B. Synthesis and characterization of new pH- and thermo-responsive hydrogels based on N-isopropylacrylamide and 2-oxazolines. *Des. Monomers Polym.* 2014; 17: 208-216.
11. Rueda JC, Suárez C, Komber H, Zschoche S, Voit B. Synthesis and characterization of pH- and thermo-responsive hydrogels based on poly(2-cyclopropyl-2-oxazoline) macromonomer, sodium acrylate, and acrylamide. *Polymer Bull.* 2020; 77: 5553-5565.
12. Lava K, Verbraeken B, Hoogenboom R. Poly(2-oxazoline)s and click chemistry: a versatile toolbox toward multi-functional polymers. *Eur Polym J.* 2015; 65: 98-111.
13. Jana S, Uchman M. Poly(2-oxazoline)-based Stimulus-Responsive (Co)polymers: An Overview of their Design, Solution Properties, Surface-chemistries and Applications. *Prog Polym Sci.* 2020; 106: 101252. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2020.101252.

14. Verbraeken B, Monnery B, Lava K, Hoogenboom R. The chemistry of poly(2-oxazoline)s. *Eur Polym J.* 2017; 88: 451-469.
15. Zschoche S, Rueda JC, Binner M, Komber H, Janke A, Arndt KF, et al. Reversibly Switchable pH- and Thermoresponsive Core-Shell Nanogels Based on Poly(NiPAAm)-graft-poly(2-carboxyethyl-2-oxazoline)s. *Macromol Chem Phys.* 2012; 213: 215-226.
16. Zschoche S, Rueda JC, Komber H, Volodymyr B, Arndt KF, Voit B. Thermo-Responsive Nanogels Based on Poly[NIPAAm-graft-(2-alkyl-2-oxazoline)]s Crosslinked in the Micellar State. *Macromol Chem Phys.* 2010; 211: 1035-1042.
17. Witte H, Seeliger W. Cyclische Imidsäureester aus Nitrilen und Aminoalkoholen. *Eur J Org Chem.* 1974; 6: 996-1009.
18. Rueda JC, Zschoche S, Komber H, Schmaljohann D, Voit B. Synthesis and Characterization of Thermoresponsive Graft Copolymers of NIPAAm and 2-Alkyl-2-oxazolines by the "Grafting from" Method. *Macromolecules.* 2005; 38: 7330-7736.
19. Greenley RZ. Free radical copolymerization reactivity ratios. In: Brandrup J, Immergut EH. *Polymer Handbook*. Third edition. New York, USA: J. Wiley & Sons; 1989.
20. Meijs GF, Rizzardo E. Reactivity of macromonomers in free radical polymerization. *J Polym Sci. Part C: Polym Lett.* 1990; 30: 305-377.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE SENÓSIDOS EN TABLETAS DE CHOCOLATE

Jhonnell Samaniego^a, Jenny Huerta^a, Miguel Inocente^a, Juan Obregón^b, Maricela López^b

RESUMEN

La industria farmacéutica, para el desarrollo de un nuevo producto, necesita utilizar un método analítico que permita cuantificar, de forma rápida y confiable, el principio activo. En la validación, se determina si el método es fiable y reproducible, por ello, en el presente trabajo, se valida un método para cuantificar senósidos en tabletas por cromatografía líquida de alta resolución, el tipo de investigación fue descriptivo con muestreo aleatorio simple. Las condiciones cromatográficas empleadas son: columna L11 (Phenyl) 15 cm x 4,6 mm x 5 µm, temperatura del horno a 40 °C, longitud de onda a 274 nm, fase móvil con gradiente de flujo que oscila entre 0,4 y 1,5 mL/minuto y de solvente, compuesta por buffer fosfato pH 3,5 y Acetonitrilo, volumen de inyección 40 µL. Los parámetros de validación evaluados confirmaron la especificidad, la linealidad a concentraciones de 0,07; 0,11; 0,15; 0,19 y 0,23 mg/mL con un coeficiente de correlación de 0,9996, la precisión con coeficiente de variación menor a 2 %, la exactitud del 98,6 % y la robustez después de 24 horas con C.V. (%) \leq 2 %. Se determina que el método propuesto es apto para la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate.

Palabras clave: validación; cromatografía líquida de alta resolución; senósidos.

VALIDATION OF A METHOD BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE QUANTIFICATION OF SENNOSIDES IN CHOCOLATE BARS

ABSTRACT

To develop a new product pharmaceutical industries, use analytical methods to quantify the active principle fast and reliable. The validation was determined if the method is reliable and reproducible, for this reason the present work validated an analytical method by high resolution liquid chromatography to quantify sennosides in chocolate bars, the type of research was descriptive with simple random sampling. The chromatographic conditions

^a Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad María Auxiliadora, Av. Canto Bello 431, San Juan de Lurigancho, Lima 15408, Perú. jhonnell.samaniego@uma.edu.pe

^b Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.

were: column L11 (Phenyl) 15 cm x 4.6 mm x 5 μ m, oven temperature at 40 °C, wavelength at 274 nm, mobile phase with a flow gradient ranging from 0.4 to 1, 5 mL / minute and solvent, composed to phosphate buffer pH 3.5 and Acetonitrile, injection volume 40 μ L. The evaluated validation parameters confirmed specificity, linearity to concentrations of 0.07; 0.11; 0.15; 0.19 and 0.23 mg / mL with a correlation coefficient of 0.9996, precision with a coefficient of variation less than 2 %, accuracy of 98.6 % and robustness after 24 hours with C.V. (%) \leq 2 %. The proposed method that the proposed method is suitable for the quantification of sennosides in chocolate bars.

Key words: validation; high performance liquid chromatography; sennosides.

INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de un producto farmacéutico es necesario utilizar un método analítico específico que permita cuantificar el principio activo en una formulación, y para asegurar su confiabilidad es necesario validarlo^{1,2,3}. Esta validación consiste en determinar diversos parámetros, que van a depender de la categoría a la que pertenezcan 4,5. Diversos organismos reguladores como la Food and Drug Administration (FDA), Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA), Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS); así como las referencias The United States Pharmacopeia (USP), International Conference on Harmonisation (ICH) y Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), exigen y recomiendan la validación como requisito imprescindible para el cumplimiento de la Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)⁴. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) posee diversas aplicaciones y, por ser una técnica automatizada, permite analizar de forma rápida y eficiente la separación, cuantificación y detección de las muestras por medio de la identificación de picos en los cromatogramas, que se pueden optimizar mediante el ajuste de múltiples variables en el método (pH de la fase móvil, concentración del buffer, flujo, temperatura de la columna, longitud de onda del detector, etc.)^{6,7,8,9,10, 11}. Al obtener un método rápido y confiable, puede ser aplicado en uso rutinario en el análisis de control de calidad y determinación de la estabilidad del medicamento^{12,13,14,15,16}. Las plantas medicinales, y su uso en salud complementaria, son tan antiguas como la aparición de la especie humana, siendo parte de las prácticas de atención familiar y comunitaria. En la actualidad, se está volviendo a utilizar las plantas medicinales en la salud y cabe resaltar que los sennósidos son un laxante natural de origen vegetal para el tratamiento de la constipación leve provocada por malos hábitos alimentarios, falta de ejercicio e inadecuada ingesta de fibra natural^{17,18,19}.

En la presente investigación se tiene como objetivo validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de sennósidos en tabletas y, para ello, establecer parámetros de validación que permitan tener la confiabilidad para el uso rutinario en la determinación de calidad de medicamentos.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos: Se utilizó potasio dihidrogenofosfato de Merck (Darmstadt, Alemania), ácido orto-fosfórico 85 % de Merck (Darmstadt, Alemania) y acetonitrilo de Merck (Darmstadt, Alemania).

Condiciones cromatográficas: Como fase móvil, se utilizaron dos soluciones: Solución A (Buffer fosfato pH 3,5) disolviendo 6,8 g de potasio dihidrogenofosfato, por cada 1000 mL de agua purificada, se ajustó a pH 3,5 con ácido orto-fosfórico 85 % y la Solución B: acetonitrilo. La columna cromatográfica utilizada fue L11 Fenilo de 150 mm x 4,6 mm x 5 μ m, el detector UV a 274 nm, la temperatura del horno a 40 °C, el volumen de inyección de 40 μ L, la velocidad de flujo de 0,4 mL/minuto, el tiempo de retención del pico principal es de 15,0 minutos y el tiempo de cada corrida es de 50 minutos.

Tabla 1. Elución en gradiente de la fase móvil de solución A y solución B.

Tiempo	Solución A	Solución B	Flujo
0,0	92,0	8,0	0,4 mL/min.
5,0	92,0	8,0	0,4 mL/min.
15,0	92,0	8,0	0,4 mL/min.
22,0	92,0	8,0	0,4 mL/min.
23,0	92,0	8,0	1,0 mL/min.
24,0	92,0	8,0	1,5 mL/min.
33,0	92,0	8,0	1,5 mL/min.
34,0	92,0	8,0	1,0 mL/min.
35,0	92,0	8,0	0,4 mL/min.
50,0	92,0	8,0	0,4 mL/min.

Preparación de estándar: Se utilizó un estándar de referencia de senósidos en solución buffer pH 3,5 a una concentración aproximada de 0,15 mg/mL que luego se filtró por una membrana de 0,45 μ m.

Preparación de la muestra: Se refrigeraron las tabletas de chocolate por 1 hora para luego fraccionarlas, se pesó una cantidad de muestra equivalente a 15 mg de senósidos en un matraz volumétrico y se le agregó 25 mL de éter de petróleo, luego se llevó a calentar en baño maría de 50 °C, hasta completa dispersión. Se adicionó 100 mL de solución buffer fosfato pH 3,5; se calentó en baño maría a 50 °C y se agitó de manera intermitente durante 30 minutos, se filtró de inmediato, a través de papel Whatman, (40) se dejó enfriar la solución y luego se filtró por membrana de 0,45 μ m, obteniendo una concentración aproximada de 0,15 mg/mL de senósidos.

Determinación de algunos parámetros de validación

Especificidad: Para la determinación de posibles interferencias, se analizó el placebo con el principio activo al 100 % y se determinó el grado de interferencia con respecto al análisis del principio activo, con y sin placebo, debiendo obtener resultados ± 2 % del teórico. En la determinación de interferencias de productos de degradación, se expusieron tanto placebo muestra y principio activo a diferentes tipos de estrés como luz UV, calor a 80 °C por 24 horas, hidrólisis ácida por 2 horas a 80 °C, hidrólisis alcalina por 2 horas a 80 °C, oxidación con peróxido al 30 % por 2 horas.

Linealidad e intervalo: Para evaluar la linealidad del sistema se prepararon 5 concentraciones en el rango de 50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 %. En la linealidad del método se prepararon soluciones de placebo enriquecida con principio activo en tres niveles 75 %, 100 % y 125 %⁵.

Exactitud: Para evaluar este parámetro se utilizaron las mismas muestras de la linealidad del método⁵.

Precisión: Para la repetibilidad se analizaron 6 muestras independientes. En la precisión intermedia, un segundo analista lo evaluó usando el mismo método analítico en diferentes equipos cromatográficos.

Robustez: Para ello se consideró tres muestras del análisis de repetibilidad como análisis inicial y ellas permanecieron 24 horas a temperatura ambiente y luego se volvió a analizar con un estándar recientemente preparado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la prueba de especificidad se evaluó las posibles interferencias originadas en la muestra, debido al estrés forzado sometido por fotólisis y termólisis, encontrándose los siguientes resultados, según tabla 2.

Tabla 2. Especificidad de posibles interferentes en senósidos en tabletas de chocolate.

Especificidad	Muestra	Senósidos					% Recuperación	
		Peso (mg)	Añadido (mg)	Hallado (mg)	Promedio hallado (mg)			
Determinación de posibles interferentes	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Pb2	0,00	0,00	0,00	0,00		
	Principio activo + placebo	M1	25,75	15,89	15,79 15,75	15,77	98,74%	
		M2	25,08	15,47	15,19 15,21	15,20		
	Fotólisis	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00 0,00	0,0	0,00
			Pb2	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	
Principio activo		PA 1	25,01	15,43	15,62 15,65	15,64	100,01	
		PA2	25,40	15,67	15,58 15,58	15,58		
Principio activo + Placebo		M1	25,50	15,73	15,52 15,48	15,50	97,90	
		M2	25,13	15,51	15,07 15,10	15,09		
Termólisis	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	0,00	
		Pb2	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00		
	Principio activo	PA1	25,07	15,47	15,62 15,62	15,62	100,00	
		PA2	25,15	15,52	15,40 15,38	15,39		
	Principio activo + Placebo	M1	25,34	15,63	15,43 15,48	15,46	99,07	
		M2	25,05	15,46	15,36 15,33	15,35		

Pb: placebo PA: principio activo M: muestra

En la tabla 3, se muestran los resultados del ensayo de Especificidad en Senósidos tabletas de chocolate sometidas a estrés forzado por hidrólisis acida, hidrólisis alcalina y estrés oxidativo.

Tabla 3. Especificidad de hidrólisis ácida, alcalina y oxidativa.

Especificidad	Muestra		Senósidos				
			Peso (mg)	Añadido (mg)	Hallado (mg)	Promedio hallado (mg)	% Recuperación
Hidrólisis ácida	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Pb2	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Principio activo	PA1	25,84	15,94	11,63	11,62	71,97
					11,61		
		PA2	24,92	15,38	10,92	10,92	
					10,91		
	Principio activo + placebo	M1	25,01	15,43	11,55	11,50	75,02
					11,45		
		M2	25,74	15,88	11,99	11,99	
					11,98		
Hidrólisis alcalina	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00
					0,00		
		Pb2	0,00	0,00	0,00	0,00	
					0,00		
	Principio activo	PA 1	25,08	15,47	13,02	13,00	83,74
					12,98		
		PA2	25,05	15,46	12,90	12,90	
					12,89		
	Principio activo + Placebo	M1	25,03	15,44	13,23	13,22	84,70
					13,21		
M2		25,03	15,44	12,94	12,97		
				12,99			
Oxidación	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
					0,00		
		Pb2	0,00	0,00	0,00	0,00	
					0,00		
	Principio activo	PA1	25,15	15,52	11,37	11,34	72,37
					11,31		
		PA2	25,23	15,57	11,15	11,16	
					11,16		
	Principio activo + Placebo	M1	25,16	15,52	7,03	7,02	45,25
					7,01		
M2		25,45	15,70	7,24	7,12		
				6,99			

Pb: placebo PA: principio activo M: muestra

En la figura 1, se reflejan los resultados obtenidos al evaluar el parámetro de Linealidad del sistema tomando las 5 concentraciones, con el siguiente resultado aplicando la ecuación de la recta para la verificación de la confiabilidad del sistema.

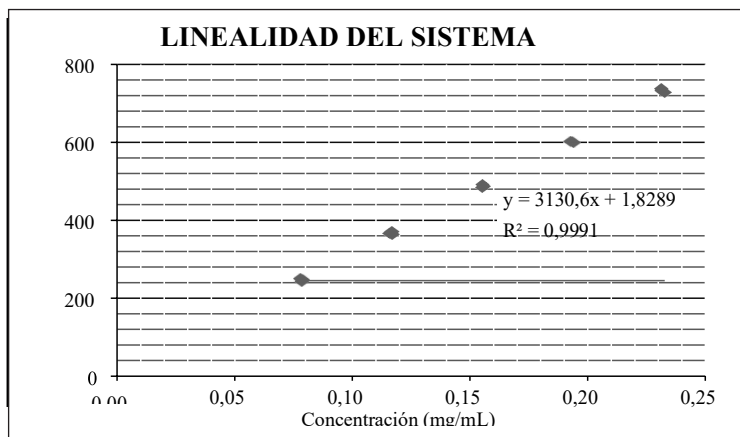


Figura 1. Área versus concentración de linealidad del sistema de senósidos en tabletas de chocolate.

En la figura 2, se esquematiza los resultados obtenidos al evaluar el parámetro de Linealidad del método tomando las 3 concentraciones como réplicas de la muestra y preparadas por duplicado, en cada una de ellas, con el siguiente resultado, aplicando la ecuación de la recta para la verificación de la confiabilidad del método.

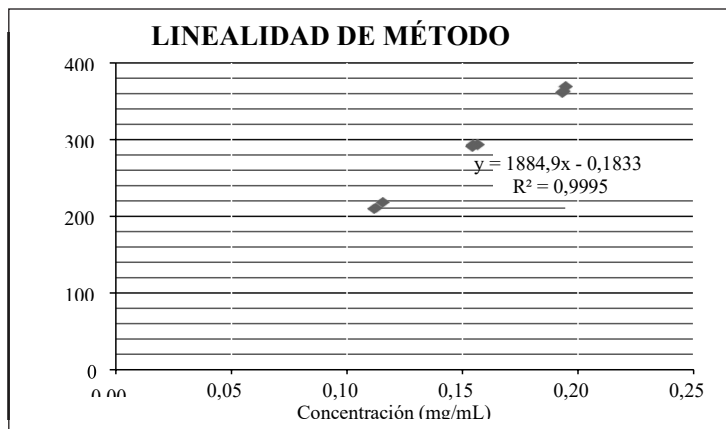


Figura 1. Área versus concentración de linealidad del método de senósidos en tabletas de chocolate.

En la tabla 4, se muestran los resultados de la evaluación del parámetro de Exactitud del método, para lo que se prepararon 3 concentraciones en el rango de trabajo establecido y luego de ello se analizaron los porcentajes de recuperación obtenidos para demostrar de esta forma si el método cumple con los criterios para demostrar su exactitud.

Tabla 4. Exactitud (recuperación) de senósidos en tabletas de chocolate.

Concentración	Muestras	Peso (mg)	Senósidos añadido (mg)	Senósidos hallado (mg)	Promedio senósidos hallado (mg)	Recuperación %
75 %	M1	18,72	11,55	11,44 11,43	11,44	99,00
	M2	18,13	11,19	10,95 11,04	11,00	98,29
	M3	18,23	11,25	11,06 11,03	11,04	98,17
100 %	M1	25,01	15,43	15,21 15,29	15,25	98,82
	M2	25,05	15,46	15,33 15,35	15,34	99,24
	M3	25,34	15,63	15,36 15,35	15,36	98,24
125 %	M1	31,51	19,44	19,31 19,30	19,31	99,30
	M2	31,37	19,36	19,02 19,02	19,02	98,26
	M3	31,28	19,30	18,94 18,93	18,93	98,10
Promedio:						98,60 %
Desviación estándar relativa:						0,0049
Coeficiente de variación (%):						0,49 %

En la tabla 5, se muestran los resultados de la evaluación del parámetro Precisión del método y para ello se realizaron los ensayos de repetibilidad de los resultados del análisis en las mismas condiciones de seis muestras y la precisión intermedia utilizando el mismo método realizado por diferentes analistas calificados.

Tabla 5. Precisión: repetibilidad y precisión intermedia entre el analista uno y dos de senósidos en tabletas de chocolate.

Muestras	Senósidos mg/tab	Analista 1		Analista 2			
		Promedio senósidos mg/tab	%	Senósidos mg/tab	Promedio senósidos mg/tab	%	
M1	15,48	15,49	103,3	15,89	15,88	105,9	
	15,50			15,86			
M2	15,36	15,34	102,3	15,63	15,61	104,0	
	15,33			15,59			
M3	15,30	15,30	102,0	15,46	15,48	103,2	
	15,30			15,50			
M4	15,61	15,60	104,0	15,57	15,67	104,5	
	15,59			15,77			
M5	15,58	15,58	103,9	15,58	15,51	103,4	
	15,58			15,44			
M6	15,38	15,38	102,5	15,73	15,70	104,6	
	15,38			15,67			
		Promedio:	103,0 %			Promedio:	104,3 %
		RSD:	0,0082			RSD:	0,0093
		C.V. (%):	0,82 %			C.V. (%):	0,93
				Promedio analista 1 y 2:		103,6 %	
				RSD del analista 1 y analista 2:		0,0106	
				C.V. (%) del analista 1 y analista 2:		1,06 %	

C.V.: coeficiente de variación RSD.: desviación estándar relativa M: muestra

En la tabla 6, se muestran los resultados del parámetro de Robustez del método, evaluando una misma muestra en condiciones de almacenamiento de refrigeración después de 24 horas, analizados frente a estándares recientemente preparados en las mismas condiciones y así determinar si el método cumple con el parámetro requerido.

Tabla6. Robustez entre análisis inicial y final de senósidos en tabletas de chocolate.

Muestra	Inicio			Final (después de 24 horas refrigerado)			Diferencia ly1 - y0l
	Senósidos mg/tab.	Promedio senósidos mg/tab.	% (y0)	Senósidos mg/tab.	Promedio senósidos mg/tab.	% (y1)	
M1	15,48	15,49	103,29	15,51	15,50	103,36	0,07
	15,50			15,50			
M2	15,36	15,34	102,29	15,32	15,34	102,25	0,05
	15,33			15,35			
M3	15,30	15,30	101,99	15,35	15,33	102,21	0,23
	15,30			15,31			
	Promedio	15,38	102,52	Promedio	15,39	102,61	
	RSD	0,0066	0,0066	RSD	0,0064	0,0064	
	C.V. (%)	0,66 %	0,66 %	C.V. (%)	0,64 %	0,64 %	
	Promedio de inicio y final (después de 24 horas refrigerado):						102,56 %
	RSD de inicio y final (después de 24 horas refrigerado):						0,0058
	C.V. (%) de inicio y final (después de 24 horas refrigerado):						0,58 %
	Diferencia del promedio de inicio y final (después de 24 horas refrigerado):						0,08

C.V.: coeficiente de variación RSD.: desviación estándar relativa M: muestra

Referente a la linealidad, debe existir una relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración (x); en la figura 1 y figura 2, se grafican las curvas de calibración (relación de áreas versus concentración) para el sistema y para el método, en las que se puede apreciar la ecuación de la recta: para linealidad del sistema $y = 3130,6x + 1,8289$ y para linealidad del método $y = 1884,9x - 0,1833$. De acuerdo a la AEFI⁵, el valor para coeficiente de correlación es recomendable que sea mayor que 0,999 y para Gary¹⁰, el valor de coeficiente de determinación debe ser mayor que 0,998; lo cual indica un ajuste aceptable de los datos a la línea de regresión, en estas condiciones los resultados para linealidad del sistema $r = 0,9996$ y $r^2 = 0,9991$ y para linealidad del método $r = 0,9997$ y $r^2 = 0,9995$, con estos valores se puede decir que existe un alto grado de relación entre la variable x (concentración) y la variable y (área).

En la tabla 4, se muestra que el porcentaje de recuperación del parámetro de exactitud, que es de 98,60 %, presenta un Coeficiente de Variación de 0,49 %, siendo estos resultados lo recomendado por AEFI5, donde los criterios de aceptación para la recuperación deben estar entre los valores 98,0-102,0 % y con un coeficiente de variación recomendado por USP 42-NF 3715 que debe ser menores a 2 %.

Para el análisis del parámetro de robustez, se evaluó la estabilidad de la muestra en una condición, muestras después de 24 horas en refrigeración, donde se observó que las muestras no sufren cambios con el método analítico y no afectan la reproducibilidad de los resultados, siendo el porcentaje de Coeficiente de Variación C.V. (%) de 0,58 %.

CONCLUSIONES

Se logró validar un método analítico para cuantificar senósidos en tabletas de chocolate por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una buena separación, una pureza de pico cromatográfico de 99,99 % para el pico del estándar y 99,94 % para el pico de la muestra, para lo cual se utilizó una columna cromatográfica de L11 (fenilo), 150 mm x 4,6 mm x 5 μ m. Se estableció un tiempo de retención de 15 minutos, aproximadamente, para el pico principal, a una longitud de onda de 274 nm, y con un volumen de inyección de 40 μ L. La gradiente de flujo establecida oscila entre 0,4 a 1,5 mL/min. Se establecieron parámetros de validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), demostrando que es específico, después de determinar las interferencias una vez sometida a estrés. Es lineal en concentraciones de 0,07; 0,11; 0,15; 0,19 y 0,23 mg/mL, con un coeficiente de correlación de 0,9996. La precisión se determinó con una repetibilidad y precisión intermedia que tiene un Coeficiente de Variación (C.V.) menor al 2 %. La exactitud mostró un porcentaje de recuperación de 98,60 % y la robustez con un coeficiente de variación de 0,58 %, después de 24 horas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The United States Pharmacopeia. USP 41. Rockville, Maryland: The United States Pharmacopeial Convention; 2018.
2. Validation of Analytical procedures:Text and Methodology Q2(R1). Geneva, Switzerland: International Conference on Harmonisation; 2005.
3. International Union of Pure and Applied Chemistry. Selectivity in Analytical Chemistry. Pure Appl Chem. 2001;73(8):1381-1386.
4. Castillo Aguilar B, González Hernández R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Rev Cubana Farm. [Internet] 1997 [Citado 11 mayo 2021]; 30(1) Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009
5. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona: Publicaciones AEFI; 2001.
6. Pacheco GJ. Evaluación de los niveles de los de Benzo[a] Pireno por Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC) en pollos. [Tesis de maestría]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2017.

7. Samaniego Joaquín J, Arias Arroyo G. Desarrollo y Validación de una Metodología Analítica por HPLC para la Cuantificación Simultánea de Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida, Cafeína y Clorfenamina Maleato en tabletas. *Rev Soc Quím Perú*. 2016;82(2):196-207.
8. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentos de Química Analítica*. Octava Edición. Madrid: Thomson Paraninfo; 2005.
9. Rubinson KA, Rubinson JF. *Análisis Instrumental*. Madrid: Pearson Educación S.A.; 2000.
10. Christian GD. *Química Analítica*. Sexta Edición ed. México: McGraw-Hill/ Interamericana Editores, S. A; 2009.
11. Bavand Savadkouhi M, Vahidi H, Ayatollahi AM, Hooshfar S, Kobarfard F. RP-HPLC Method Development and Validation for Determination of Eptifibatide Acetate in Bulk Drug Substance and Pharmaceutical Dosage Forms. *Iran J Pharm Res*. 2017;16(2):490-497.
12. Bor M, Guilarte A, Guzmán L, Macías K, Mendoza W. Validación de un método por RP-HPLC para la determinación de Tiocolchicósido en tabletas. *Afinidad* 2017; 75(581):32-38.
13. Funes JI, Meza MN, Ponce HD. Desarrollo y validación de un método para la cuantificación de atorvastatina en tabletas mediante HPLC-DAD. *Portal de la Ciencia* 2016; 9:27-41.
14. Guarniz Aguilar D. Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la disolución de Ezetimiba 10 mg y Simvastatina 40 mg en tabletas. [Tesis grado de bachiller]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2017.
15. Ccorimanya Gutierrez K. Desarrollo y Validación Prospectiva de una técnica analítica por Cromatografía Líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar Lidocaina Base en una pomada, Arequipa-2012. [Tesis de título de Químico Farmacéutico]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2012.
16. Enciso Rodríguez M. Validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la determinación de fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato en jarabe. Lima -2013. [Tesis de título de Químico Farmacéutico]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2014.
17. Heisler EV, Buda MLD, Schimith MD, Badke MR, Ceolin S, Heck RM. Uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud: la producción científica de tesis y disertaciones de enfermería brasileña. *Enferm Glob*. 2015;14(39):390-403.
18. Gennaro AR. *Remington Farmacia*. 20° Edición ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana; 2003.
19. Mattos Gesteira E, Alonso Beato MT, Santos Bobillo MT, Miguel Ladero Álvarez M, Ladero Santos I. Plantas medicinales españolas. Familia Leguminosae. *Stud Bot*. 2009; 28: 9-156.



**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**