

ISSN Impreso: 1810-634X  
ISSN on line. : 2309-8740

# REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

Volumen 89 N° 3  
JULIO - SETIEMBRE 2023



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**

Dra. Angélica Baena Moncada  
Universidad Nacional de Ingeniería

Dr. Adolfo La Rosa Toro Gomez  
Universidad Nacional de Ingeniería

M.Sc. José G. Beretta Enciso  
Universidad Nacional de Ingeniería

Dra. Celina Luizar  
Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Olivio Nino Castro Mandujano  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Dra. Ana Valderrama Negrón  
Universidad Nacional de Ingeniería

Dra. Yadira Fernandez Jerí  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

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

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

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

Certificado N 95-1567

---

**Vol 89**

**JULIO - SETIEMBRE 2023**

**N° 3**

En el Perú: N° suelto S/ 15

Suscripción anual: S/ 60.00

En el extranjero suscripción anual: US \$ 50



**SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**  
**CONSEJO DIRECTIVO**  
**(marzo 2022 – marzo 2024)**

<b>Presidente</b>	: Dra. Santos Haydeé Chávez Orellana
<b>Tesorera</b>	: Dra. Ana Lucy Siccha Macassi
<b>Secretario</b>	: Mg. Mario Antonio Bolarte Arteaga
<b>Director Administrativo</b>	: Mg. Helmer Helí Lezama Vigo
<b>Vocales</b>	: Q.F. Gabriela Soriano Chávez Mg. Norma Amparo Cuizano Vargas Mg. Fernando Carlos Carrasco Solís Dra. Magali Camila Vivas Cuéllar Dra. Mercedes Puca Pacheco MSc. Christian Ronald Jacinto Hernández

**Comisión de Economía y Finanzas**

Presidenta: Dra. Ana María Osorio Anaya

**Comisión de Publicaciones**

Presidenta: Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón

**Comisión de Actuaciones Científicas**

Presidenta: Mg. Fernando Carrasco Solís

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



## CONTENIDO

(Vol. 89 – N° 3 – 2023)

- Caracterización fisicoquímica y capacidad antioxidante del extracto de *Vaccinium floribundum* Kunth “pushgay” por, Gaby Espinoza-Córdova, Mónica Guadalupe Retuerto-Figueroa, Celia Vargas-De La Cruz, Jossimar Paúl Huamaní Tarazona, Marco Rolando Aronés-Jara, María Rosario Calixto-Cotos, Eva Ramos-Llica, Tania Torres Aguilar, Arilmi Gorriti Gutiérrez, Fabio Espichán. Págs. 182-192
- Combustión de hollín usando catalizadores basados en óxidos de níquel(II) y cerio(IV): Preparación, caracterización y estudio cinético por, Nelson Arcos, Mario Hurtado Cotillo, Rómulo Cruz, Gino Picasso, Rosario López. Págs. 194-212
- Composición química, actividad antioxidante, antibacteriana y anti-*Candida albicans* *in vitro* del aceite esencial de las hojas de *Cinchona pubescens* Vahl. por, Américo Castro Luna, Norma Ramos Cevallos, Jose Ponce Cobos, Donal Ramos Perfecto, Lourdes Victoria Tinoco, Felix Castillo Morales. Págs. 213-226
- Decoloración de efluentes textiles que contienen colorantes reactivos mediante el método de electro-oxidación con electrodos de titanio por, Teodardo J. Cárdenas Mendoza, Maria Quinto Sánchez, Emilia G. Hermoza Guerra, Carmen L. Uribe Valenzuela. Págs. 227-239
- Determinación de la eficiencia de secreción de una proteína recombinante en la levadura *S. Cerevisiae* mediante análisis electroforético y detección por Western Blot por, Sandy Nelly Mansilla García, Ana Akemi Kitazono Sugahara. Págs. 240-248
- ¿Es esto un Bitti? Evaluación química de los pigmentos presentes en “El Señor de la Caída” por, Jhonatan Arízaga Torres, Patricia Gonzales Gil, Nancy Junchaya Rojas. Págs. 249-265
- Informaciones

---

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 al correo electrónico [revsqperu@gmail.com](mailto:revsqperu@gmail.com) a la Comisión de Publicaciones, junto con una carta dirigida al editor y abonarán 30 soles (autores nacionales) ó 30 dólares (autores extranjeros) por concepto de gastos administrativos (por revisión del artículo), 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.

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 [revsqp@gmail.com](mailto:revsqp@gmail.com)

El texto completo, debe ser escrito en formato Microsoft Word, tamaño de página A4. Márgenes; izquierdo 3 cm, derecho 3 cm, superior 3 cm, inferior 3 cm. Espacio 1 1/2, 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.

Los idiomas de publicación son español e inglés.

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.

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.).

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).

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.

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.

Las tablas, fotos, figuras y esquemas deben estar incluidos en el documento de Microsoft Word.

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 las 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.



## CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE *VACCINIUM FLORIBUNDUM* KUNTH “PUSHGAY”.

Gaby Espinoza-Córdova<sup>\*a</sup>, Mónica Guadalupe Retuerto-Figueroa<sup>a</sup>, Celia Vargas-De-La-Cruz<sup>b</sup>, Jossimar Paúl Huamaní Tarazona<sup>a</sup>, Marco Rolando Aronés-Jara<sup>c</sup>, María Rosario Calixto-Cotos<sup>d</sup>, Eva Ramos-Llica<sup>a</sup>, Tania Torres Aguilar<sup>a</sup>, Arilmi Gorriti Gutiérrez<sup>a</sup>, Fabio Espichán<sup>e</sup>.

### RESUMEN

El fruto del *Vaccinium floribundum* Kunth “pushgay”, integra al grupo de los berries nativos, el cual presenta una gran cantidad de antioxidantes, mucho mayor que los arándanos que actualmente se exportan a diferentes países. El objetivo de este estudio fue la determinación de los parámetros físicoquímicos y la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto vegetal del *Vaccinium floribundum* Kunth. Se prepararon extractos por maceración a partir de frutos liofilizados, usando como solvente etanol al 50 %, 70 % y 96 %. Los extractos presentaron valores similares de densidad relativa, sólidos totales, índice de refracción, grados Brix y pH. El tamizaje fitoquímico evidenció la presencia de carbohidratos, azúcares reductores, taninos, compuestos amino y heterósidos, destacando los compuestos fenólicos y flavonoides de relevante capacidad antioxidante. El extracto al 50 % presentó mayor contenido de fenoles totales ( $38,131 \pm 0,242$  mg GAE/g extracto); así como, mayor capacidad antioxidante por el método DPPH (TEAC  $28089,156 \pm 147,482$   $\mu\text{g/mL}$ ). El extracto al 96 % presento (TEAC  $13609,683 \pm 21,669$   $\mu\text{g/mL}$ ). Se concluye que el extracto hidroalcohólico del pushgay al 50 % presenta mayor capacidad antioxidante que sostiene correlación con la cantidad de compuestos fenólicos con el método de DPPH.

**Palabras clave:** actividad antioxidante, tamizaje fitoquímico, DPPH, ABTS, fenoles, *Vaccinium floribundum* Kunth.

---

<sup>a</sup> Facultad de Farmacia y Bioquímica-Laboratorio de Farmacognosia, Grupo de Investigación Farmacognosia y Medicina Tradicional, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú. \*gaby.espinoza1@unmsm.edu.pe

<sup>b</sup> Departamento Académico de Farmacología, Toxicología y Bromatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

<sup>c</sup> Departamento de Medicina Humana, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 05001, Huamanga, Ayacucho, Perú.

<sup>d</sup> Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Química e Ingeniería Química. UNMSM.

<sup>e</sup> Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), Lima, Perú.

# PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF *VACCINIUM FLORIBUNDUM* KUNTH “PUSHGAY” EXTRACT

## ABSTRACT

The fruit of the *Vaccinium floribundum* Kunth “pushgay” is part of the group of native berries, which has a large amount of antioxidants, much greater than the blueberries that are currently exported to different countries. The objective of this study was the determination of the physicochemical parameters and the in vitro antioxidant capacity of the plant extract of *Vaccinium floribundum* Kunth. Extracts were prepared by maceration from freeze-dried fruits, using 50%, 70% and 96% ethanol as a solvent. The extracts presented similar values of relative density, total solids, refractive index, degrees Brix and pH. Phytochemical screening showed the presence of carbohydrates, reducing sugars, tannins, amino compounds and heterosides, highlighting phenolic compounds and flavonoids with relevant antioxidant capacity. The 50% extract had a higher content of total phenols ( $38,131 \pm 0,242$  mg GAE/g extract); as well as, greater antioxidant capacity by the DPPH method (TEAC  $28089,156 \pm 147,482$   $\mu\text{g/mL}$ ). The 96% extract presented (TEAC  $13609,683 \pm 21,669$   $\mu\text{g/mL}$ ). It is concluded that the 50% hydroalcoholic extract of pushgay has greater antioxidant capacity that maintains a correlation with the amount of phenolic compounds with the DPPH method.

**Key words:** antioxidant capacity, screening, DPPH, ABTS, polyphenols, *Vaccinium floribundum* Kunth.

## INTRODUCCIÓN

El *Vaccinium floribundum* Kunth conocido como pushgay, mortiño o arándano andino, pertenece a la familia Ericaceae, siendo el género *Vaccinium* el más representativo. Se distribuye en América del Sur, principalmente Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela, en altitudes entre 1800 a 3800 m.s.n.m. El fruto es una baya esférica de 0,5 a 0,8 cm de diámetro de color azul a azul oscuro de textura lisa y con sabor dulce <sup>(1)</sup>. El consumo de este fruto proporciona antioxidantes exógenos y disminuye el riesgo de enfermedades cerebrovasculares <sup>(2)</sup>.

La mayoría de los compuestos bioactivos de esta planta, se encuentran en el fruto, siendo los flavonoides y ácidos fenólicos los resaltantes pertenecientes al grupo de los fenoles <sup>(1)</sup>, los cuales presentan propiedades antioxidantes por su alta capacidad de neutralizar especies radicalarias <sup>(3)</sup>. Últimas investigaciones evidencian que los radicales libres y las especies reactivas intervienen en las reacciones celulares de nuestro organismo causando daños oxidativos, sin embargo, una dieta rica en vitaminas y compuestos fenólicos previenen reacciones que pueden generar especies más nocivas <sup>(4)</sup>.

Por lo que existe una tendencia para investigar las propiedades beneficiosas del *Vaccinium floribundum* Kunth. En el Perú, se puede ubicar de forma silvestre al pushgay en las provincias de Chota, Cajabamba, Celendín, Hualgayoc y San Marcos, pertenecientes a la región de Cajamarca. Los pobladores lo consumen directamente como fruta fresca o en productos procesados como mermeladas, helados, jugos y vinos, por otra parte; ciertas comunidades nativas de la región lo utilizan de manera tradicional en forma

de extracto para aliviar enfermedades como la diabetes e inflamaciones <sup>(5)</sup>; no obstante ante la carencia de información científica que validen su utilización en nuestro país, nos planteamos los objetivos de determinar los parámetros físicoquímicos, capacidad antioxidante *in vitro* y caracterización fitoquímica del extracto hidroalcohólico del *Vaccinium floribundum* Kunth que impulsaría su cultivo y consumo para la salud humana.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material Vegetal

Se utilizó el fruto (baya) del *Vaccinium floribundum* Kunth proveniente de la provincia de San Marcos de la región de Cajamarca. La recolección y clasificación taxonómica fue realizada por el taxónomo José Ricardo Campos de la Cruz.



**Figura 1.** Frutos enteros del *Vaccinium floribundum* Kunth “pushgay”.

### Preparación del extracto hidroalcohólico

Se seleccionó los frutos sanos y enteros, libres de hongos y sin golpes, se procedió a lavar con abundante agua y se congeló la muestra a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su almacenamiento. Posteriormente se sometieron a un proceso de liofilización (para evitar la degradación de compuestos termolábiles) a una temperatura de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 900 mmHg de presión, finalmente se obtuvo un polvo seco deshidratado. El polvo seco deshidratado fue macerado durante 3 días en una solución hidroalcohólica a diferentes concentraciones 50 %, 70 % y 96 %, finalizado el proceso se filtró para obtener el extracto y se almacenó en un frasco ámbar en refrigeración para su posterior uso <sup>(6)</sup>.

### Tamizaje fitoquímico

El análisis para la determinación de los diferentes constituyentes químicos del extracto hidroalcohólico del fruto del *Vaccinium floribundum* Kunth “pushgay” a diferentes concentraciones 50 %, 70 % y 96 % fue realizado mediante ensayos de coloración y precipitación según Lock de Ugaz <sup>(7)</sup>.

### **Determinación de los parámetros fisicoquímicos**

Los parámetros fisicoquímicos analizados fueron densidad relativa, sólidos totales, pH, índice de refracción y grados Brix según los métodos oficiales de la AOAC (2023), por triplicado <sup>(8)</sup>.

### **Determinación de Fenoles Totales por el método de Folin–Ciocalteu**

El contenido de fenoles totales fue realizado según la metodología descrita por Ivanova *et al.*<sup>(9)</sup>, se prepararon diluciones del extracto hidroalcohólicos de diferentes concentraciones del fruto del *Vaccinium floribundum* Kunth “Pushgay” hasta alcanzar concentraciones de 0,99 µg/mL a 7,92 µg/mL. Posteriormente se añadió 2,5 mL de Folin-Ciocalteu y 2 mL de carbonato de calcio al 7,5 %, los tubos se homogenizaron y se incubaron en baño maría a 45°C por 15 minutos, pasado el tiempo de incubación se enfrió la batería de tubos en un lugar oscuro por 15 minutos. Finalmente se realizaron las lecturas de absorbancias a 760 nm. Conjuntamente, se empleó como patrón de referencia ácido gálico, la curva se preparó con concentraciones de 9,90 µg/mL a 79,20 µg/mL con un valor de R<sup>2</sup> igual a 0,9968. El contenido total de fenoles totales fue expresado en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg GAE/g de extracto) <sup>(9)</sup>.

### **Análisis de Actividad Antioxidante**

La actividad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico se determinó por los métodos de DPPH y ABTS.

### **Método de inhibición frente al radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidraizilo (DPPH)**

Se usó el método propuesto por Brand-Williams *et al.* <sup>(10)</sup>. Se prepararon diluciones del extracto hidroalcohólico de diferentes concentraciones del fruto “pushgay” hasta alcanzar concentraciones de 13,4765 µg/mL a 215,6250 µg/mL. Posteriormente se añadió 1 mL de DPPH disuelto en etanol. Luego de 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente se realizaron las lecturas de absorbancias a 517 nm. Conjuntamente, se empleó como patrón de referencia trolox, la curva se preparó con concentraciones de 1,25 µg/mL a 6,25 µg/mL con un valor de R<sup>2</sup> igual a 0,9957. Los resultados se expresaron en capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC-DPPH) y concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) (µg de muestra seca/mL) <sup>(10)</sup>.

### **Método de decoloración con el radical catiónico 2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-sulfónico) (ABTS\*+)**

Según Roberta *et al.*<sup>(11)</sup>. Se prepararon diluciones del extracto hidroalcohólico de diferentes concentraciones del fruto del *Vaccinium floribundum* Kunth “pushgay” hasta alcanzar concentraciones de 0,0808 µg/mL a 1,2937µg/mL. Posteriormente se añadió 1,5 mL de ABTS disuelto. Luego de 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente se realizaron las lecturas de absorbancias a 734 nm. Conjuntamente, se empleó como patrón de referencia trolox, la curva se preparó con concentraciones de 0,625 µg/mL a 5 µg/mL con un valor de R<sup>2</sup> igual a 0,9983. Los resultados se expresaron en capacidad antioxidante

equivalente a trolox (TEAC-ABTS) y concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) (µg de muestra seca/mL) <sup>(11)</sup>.

### Análisis estadístico

Los parámetros físicoquímicos, capacidad antioxidante y fenoles totales fueron realizados por triplicado. Los resultados obtenidos se expresaron como el promedio ± desviación estándar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros evaluados como control de calidad de la fruta fueron la densidad relativa, sólidos totales, índice de refracción, grados brix y el pH (Tabla 1). La densidad relativa de los extractos hidroalcohólicos a diferentes concentraciones es ligeramente inferior a la densidad del agua (0,829-0,948 g/mL). El pH de los tres extractos está en un rango ácido, presentando mayor acidez el extracto al 50 %. Estos resultados de pH son similares al reportado para *V. floribundum* proveniente de los andes ecuatorianos (pH 3,20). La acidez se debe a los ácidos orgánicos, principalmente al ácido cítrico, presente en la fruta <sup>(12)</sup>. Finalmente, los datos reportados favorecen al incremento de información sobre el berry nativo pushgay proveniente de la región Cajamarca, cabe resaltar que estos parámetros físicoquímicos pueden ser diferentes entre especies y variedades por influencia de las condiciones ambientales y su adaptación agronómica <sup>(13)</sup>. Las características organolépticas de los extractos presentaron un color rojo violáceo, olor característico y aspecto líquido. El porcentaje de rendimiento del liofilizado de los frutos del pushgay fue 36,71%, esto puede deberse al contenido de humedad presentado en la baya con 83% <sup>(6)</sup>.

**Tabla 1.** Resultados de los parámetros físicoquímicos del extracto hidroalcohólicos al 50 %, 70 % y 96 % del fruto del *Vaccinium floribundum* Kunth “pushgay”.

Extracto del fruto pushgay	DR <sup>(1)</sup>	ST <sup>(2)</sup>	IR <sup>(3)</sup>	°BX <sup>(4)</sup>	pH
Extracto 50 %	0,948 ± 0,00	0,124 ± 0,00	1,361 ± 0,00	18,00 ± 0,00	3.397 ± 0,01
Extracto 70 %	0,906 ± 0,00	0,119 ± 0,00	1,366 ± 0,00	21,50 ± 0,00	4.000 ± 0,00
Extracto 96 %	0,829 ± 0,00	0,094 ± 0,00	1,367 ± 0,00	22,00 ± 0,00	3.980 ± 0,00

Valores (promedio ± DS)

1) Densidad relativa: g/mL a 20,1 °C

2) Sólidos totales: del extracto mg/mL

3) Índice de refracción.

4) Grados Brix: extracto seco disuelto en el solvente a 20,1 °C

La Tabla 2 muestra resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los tres extractos hidroalcohólicos del fruto de *Vaccinium floribundum* Kunth “pushgay”, destacando la presencia de carbohidratos, azúcares reductores, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, compuestos amino y heterósidos en todos los extractos. Investigaciones como las de Cerrato, A *et al.* <sup>(14)</sup>, son semejantes a nuestros resultados, por evidenciar la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en la baya pushgay <sup>(14)</sup>, los cuales poseen

actividades biológicas beneficiosos como la capacidad antioxidante, reducción del estrés oxidativo y daño mitocondrial, además de disminuir los riesgos de ECV por la reducción de la disfunción endotelial <sup>(5)</sup>.

De forma preliminar en el tamizaje fitoquímico se determinó la presencia de flavonoides, estudios realizados por Llerena W. *et al.*<sup>(6)</sup>, reportan la presencia de antocianinas (flavonoides) como responsables de la pigmentación morado - azul oscuro del pushgay <sup>(6)</sup>. Por último, estudios de Nieves Baenas *et al.*<sup>(13)</sup>, confirman la presencia de carbohidratos en la baya nativa pushgay otorgándole el sabor dulce y agradable para su consumo directo <sup>(13)</sup>.

**Tabla 2.** Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólicos al 50 %, 70 % y 96 % del fruto del *Vaccinium floribundum* Kunth “pushgay”.

N°	Reactivo	Extracto	Extracto	Extracto	Constituyentes químicos
		50 %	70 %	96 %	
1	Molish	+	+	+	Carbohidratos
2	Antrona	+	+	+	Carbohidratos
3	Fehling	+	+	+	Azúcares reductores
4	FeCl <sub>3</sub>	+	+	+	Compuestos fenólicos
5	Shinoda	+	+	+	Flavonoides
6	Rosenheim	-	-	-	Catequinas
7	Borntrager	-	-	-	Compuestos antraquinónicos
8	Gelatina	+	+	+	Taninos
9	Liebermann-Burchard	-	-	-	Compuestos triterpenoides
10	Ninhidrina	+	+	+	Compuestos amino
11	Dragendorff	-	-	-	Alcaloides
12	Mayer	-	-	-	Alcaloides
13	Bertrand	-	-	-	Alcaloides
14	Sonnenschein	-	-	-	Alcaloides
15	Ensayo de la espuma	-	-	-	Saponinas
16	Vainillina sulfúrica	+	+	+	Heterósidos

Leyenda:

Presencia: +; Ausencia: -



En la Tabla 3, se reporta la capacidad antioxidante de los tres extractos de pushgay a diferentes concentraciones 50 %, 70 % y 96 %. Por el método DPPH se determinó que el extracto hidroalcohólico al 50 % presenta mayor capacidad antioxidante expresado por el menor valor de IC 50 ( $121,488 \pm 0,404 \mu\text{g/mL}$ ) en comparación a los demás extractos. Por el ensayo de ABTS el extracto hidroalcohólico al 96 % presenta mayor capacidad antioxidante expresado por el menor valor de IC 50 ( $38,874 \pm 0,119 \mu\text{g/mL}$ ) en relación con los extractos de 50 % y 70 %.

Con respecto al contenido de fenoles totales (Tabla 3), se realizó una curva patrón para el ensayo de Folin – Ciocalteu correspondiente al ácido gálico con un valor de  $R^2$  igual a 0,9968, a partir de la gráfica obtenida de los valores de absorbancia y concentración. El contenido de fenoles totales en los extractos de pushgay a diversas concentraciones 50 %, 70 % y 96 % corresponden a los siguientes valores  $38,131 \pm 0,242$ ,  $34,780 \pm 0,145$  y  $27,510 \pm 0,046$  (*mg EAG/g extracto*) respectivamente. Se demostró que el CPT del pushgay proveniente de las zonas de Cajamarca tiene hasta cuatro veces más contenido de fenoles totales en comparación con las bayas provenientes de la región de Ecuador ( $9,25 \text{ mg EAG/g extracto}$ )<sup>(15)</sup>. Reportes de investigaciones como Alarcón-Barrera *et al.*<sup>(15)</sup>, evidenciaron que el contenido de fenoles totales (CPT) en las bayas del pushgay provenientes de las zonas altoandinas de Ecuador contienen  $9,25 \text{ mg EAG/g extracto}$  siendo mayor en comparación con las fresas, frambuesas y las moras andinas provenientes de la misma región con un valor de  $2,66 \text{ mg EAG/g extracto}$ <sup>(15)</sup>, esto podría deberse que los compuestos fenólicos de una misma especie pueden variar significativamente según el origen geográfico, factores externos como el clima y diferentes métodos de obtención de sus extractos; cabe resaltar que el pushgay (berry nativo) es una fuente natural con alto contenido de compuesto fenólicos y el consumo de estos presentan un gran beneficio natural para la salud por su relevante capacidad antioxidante<sup>(13,15)</sup>.

Investigaciones como las de Cerrato A *et al.*<sup>(14)</sup>, afirman la presencia de varios compuestos polifenólicos como el ácido gálico, los derivados del ácido hidroxibenzoico (ácido vanílico y p-hidroxibenzoico), los flavan-3-oles y proantocianidinas (catequina y epicatequina), derivados de flavonol (quercetina y miricetina) y derivados del ácido hidroxicinámico (ácido clorogénico, cafeico, ferúlico y p-cumárico)<sup>(14)</sup>, los cuales presenta una actividad antioxidante neutralizando a las especies oxidantes y las radicalarias, adicionalmente estos compuestos bioactivos mitigan la incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles como la diabetes y enfermedades cardiovasculares<sup>(16)</sup>.

El análisis de fenoles totales en los extractos de pushgay presentó capacidad antioxidante. En este ensayo se determinó la concentración de extracto del pushgay necesario para disminuir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH, teniendo en consideración que un IC 50 bajo representa una actividad antioxidante alta. Ramos *et al.*<sup>(17)</sup>, reportan criterios para clasificar una capacidad antioxidante, un IC 50 menor a  $30 \mu\text{g/mL}$  presenta un alto potencial antioxidante, un IC 50 entre a  $30 \mu\text{g/mL}$  a  $100 \mu\text{g/mL}$  presenta un moderado potencial antioxidante y un IC 50 superior a  $100 \mu\text{g/mL}$  presenta un bajo potencial antioxidante<sup>(17)</sup>. Como se observa en la Tabla 3, los valores de IC 50 en los tres extractos superan los  $100 \mu\text{g/mL}$ , sin embargo se podría resaltar el extracto al 50% que mostró el menor IC 50 con un valor  $121,488 \pm 0,404 \mu\text{g/mL}$ , lo cual indicaría un bajo potencial antioxidante del pushgay, esto podría deberse a la presencia de ciertos compuestos bioactivos susceptibles a la variación de pH, como son las antocianinas, a pH ácidos de 1 a 2 las antocianinas se mantienen en su forma más estable representado por el catión flavilium (color rojizo), a pH débilmente ácidos, neutro y básicos el carbinol y

las formas de base quinonoidal predominan, por lo que el color rojizo se decolora; entonces se puede decir que un factor clave en la alteración y degradación de las estructuras de las antocianinas es el pH, puesto que en la preparación de los extractos hidroalcohólicos a diferentes concentraciones se debió acidificar con HCl 0.1 M y así mantener las formas más estables de las antocianinas, además de las condiciones frías y en oscuridad<sup>(18)</sup>.

Para el análisis *in vitro* se recomienda ensayar al menos dos métodos para evidenciar resultados confiables, por lo cual se utilizaron los métodos de DPPH y ABTS para evaluar la capacidad antioxidante. Los extractos del pushgay evaluados por el método ABTS mostraron un IC 50 mejor que el trolox (IC 50 trolox = 3,4238 ug/mL), cabe resaltar que el extracto al 96 % presentó un IC 50 ligeramente menor ( $0,621 \pm 0,002$  ug/mL) en comparación con los otros extractos, esto puede deberse a que la actividad antioxidante evaluada mediante el método ABTS puede evaluarse en extractos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, caso contrario sucede en el DPPH que solo puede medir la capacidad antioxidante en medios orgánicos; estudios de Kuti *et al.*<sup>(19)</sup>, evidenciaron mayor capacidad antioxidante en extractos etanólicos que acuosos, lo cual es un limitante para la cuantificación de la capacidad antioxidante de los compuestos con una polaridad similar al agua, como sería el caso de las antocianinas, ya que estas son solubles principalmente en solventes con una polaridad elevada. Sin embargo, el potencial antioxidante también se ve influenciado por el tipo de estructura polifenólica de la molécula, específicamente por la estructura de un azúcar glucósido que al estar conjugada con el azúcar posee alta actividad antioxidante debido al -OH unido al anillo A, B o C de una molécula de flavonoides<sup>(19)</sup>.

En las investigaciones de Pio Prencipe *et al.*<sup>(20)</sup>, sobre la capacidad antioxidante por el método ABTS en extractos de las bayas del pushgay provenientes del sur de Quito (Ecuador) evidenciaron valores de IC 50 de 0,339 ug/mL, mostrando similitudes con los ensayos realizados en la presente investigación (Tabla 3), cabe recalcar que el ensayo experimental se realizó en la misma especie *Vaccinium floribundum* Kunth pero proveniente de la región Cajamarca (Perú)<sup>(20)</sup>.

Finalmente, la capacidad antioxidante de una fruta está relacionada con los efectos sinérgicos de los compuestos fenólicos, Rojas-Campo *et al.*<sup>(21)</sup>, en sus investigaciones muestra valores bajos de CPT (1,91 mg EAG/g extracto), esto debido a que las extracciones de la baya se obtuvieron con agua, caso contrario se observa en los resultados obtenidos, ya que estos fueron elaborados a base de etanol a diferentes concentraciones presentando mayor contenido de compuestos fenólicos (Tabla 3), esto se puede explicarse por la alta polaridad de las antocianinas, principalmente los compuestos fenólicos por la elevada afinidad a solventes polares<sup>(21)</sup>.

Adicionalmente se puede comparar el TEAC de diferentes bayas y frutas para conocer el mejor potencial antioxidante, Rojas-Campo *et al.*<sup>(21)</sup>, en su investigación determina el TEAC por el método ABTS de diversas bayas como es el pushgay ecuatoriano, sauco, mora y aguaymanto con valores de 3,39, 6,57, 6,34 y 1,5 umol trolox/ g extracto seco respectivamente, observando que el pushgay de la región de Cajamarca triplica el valor, lo que refleja grandes diferencias entre genotipos, variedades, desarrollo y etapas de maduración del fruto, además del contenido de compuestos fenólicos, por lo que el Pushgay puede proporcionar una excelente fuente de antioxidantes en la dieta diaria con posibles beneficios para la salud humana<sup>(21)</sup>.

**Tabla 3.** Resultados del contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico del fruto del *Vaccinium floribundum* Kunth “pushgay”.

Extracto del fruto Pushgay	CPT <sup>(1)</sup>		IC 50 <sup>(2)</sup>		TEAC <sup>(3)</sup>		TEAC <sup>(4)</sup>	
	(mg EAG/g extracto)	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	
Extracto 50 %	38,131 ± 0,242	121,488 ± 0,404	0,734 ± 0,002	28089,156 ± 147,482	4150,452 ± 0,470	112,226 ± 0,589	16,582 ± 0,049	
Extracto 70 %	34,780 ± 0,145	134,857 ± 0,715	0,822 ± 0,001	26254,202 ± 107,716	3676,016 ± 0,071	104,895 ± 0,430	14,687 ± 0,034	
Extracto 96 %	27,510 ± 0,046	239,685 ± 0,171	0,621 ± 0,002	13609,683 ± 21,669	4894,558 ± 0,120	54,375 ± 0,086	19,555 ± 0,059	

Valores (medio ± DS)

1) Contenido de fenoles totales: mg de ácido gálico equivalente (EAG)/g de extracto seco de baya.

2) Concentración inhibitoria media: µg extracto / mL necesario para reducir al 50 % la concentración inicial del radical DPPH o ABTS.

3) Capacidad antioxidante equivalente a trolox: µg de trolox/g extracto seco.

4) Capacidad antioxidante equivalente a trolox: µmol de trolox/g extracto seco.

## CONCLUSIONES

Los parámetros físicoquímicos (densidad relativa, sólidos totales, índice de refracción, grados brix y pH) sirven como herramienta de control de calidad.

La mayor capacidad antioxidante se obtuvo en el extracto del *Vaccinium floribundum* Kunth “pushgay” al 50% con TEAC de 28089,156 ±147,482 µg de trolox/g extracto seco. En general, nuestros resultados obtenidos proporcionan evidencia sobre la constitución química y capacidad antioxidante del arándano andino silvestre más conocido como pushgay, *Vaccinium floribundum* Kunth, lo que lo hace potencialmente promisorio por sus altos valores de compuestos fenólicos.

## AGRADECIMIENTO

Al laboratorio de Farmacognosia y Medicina Tradicional – Q.F. Bertha Jurado Teixeira de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

A PROCENCIA por el financiamiento otorgado para el desarrollo del presente trabajo de investigación, bajo el marco del convenio PE501079695-2022-PROCENCIA y al Vicerectorado de Investigación-UNMSM. Los datos e información obtenida en el presente trabajo son partes de la tesis Caracterización físicoquímica, capacidad antioxidante y toxicidad del extracto de *Vaccinium floribundum* kunth “pushgay”.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Meléndez-Jácome MR, Flor-Romero LE, Sandoval-Pacheco ME, Vasquez-Castillo WA, Racines-Oliva MA. *Vaccinium* spp.: Karyotypic and phylogenetic characteristics, nutritional composition, edaphoclimatic conditions, biotic factors and

- beneficial microorganisms in the rhizosphere. *Sci Agropecu.* 15 de marzo de 2021;12<sup>1</sup>:109-20.
2. Basu A, Rhone M, Lyons TJ. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutr Rev.* marzo de 2010;68<sup>3</sup>:168-77.
  3. Isnaini I, Permatasari N, Mintaroem K, Prihartini B, Widodo MA. Oxidants-Antioxidants Profile in the Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Asian Pac J Cancer Prev.* 1 de noviembre de 2018;19<sup>11</sup>:3175-8.
  4. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea Concepc [Internet].* 2006 [citado 10 de diciembre de 2023];(494). Disponible en:  
[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-04622006000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-04622006000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
  5. Marracino L, Punzo A, Severi P, Nganwouo Tchoutang R, Vargas-De-la-Cruz C, Fortini F, et al. Fermentation of *Vaccinium floribundum* Berries with *Lactiplantibacillus plantarum* Reduces Oxidative Stress in Endothelial Cells and Modulates Macrophages Function. *Nutrients.* 8 de abril de 2022;14<sup>8</sup>:1560.
  6. Llerena W, Samaniego I, Ramos M, Brito B. Physicochemistry and functional characterizations of six tropical andandean ecutorian fruits. 2014. 10 de noviembre de 2014;22<sup>2</sup>:13-22.
  7. Lock O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. (2016). 3ra. Edición. Departamento de Ciencias-Pontificia Universidad Católica del Perú. 287 pp.
  8. Association of Official Analytical Chemists. 2005. Official methods of analysis of the AOAC International. 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
  9. Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* enero de 2005;96<sup>1-2</sup>:145-50.
  10. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1995;28<sup>1</sup>:25-30.
  11. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* mayo de 1999;26<sup>9-10</sup>:1231-7.
  12. Llerena W, Samaniego I., Physicochemistry and functional characterizations of six tropical andandean ecutorian fruits. 2014. 10 de noviembre de 2014;22<sup>2</sup>:13-22.
  13. Baenas N, Ruales J, Moreno DA, Barrio DA, Stinco CM, Martínez-Cifuentes G, et al. Characterization of Andean Blueberry in Bioactive Compounds, Evaluation of Biological Properties, and In Vitro Bioaccessibility. *Foods.* 17 de octubre de 2020;9<sup>10</sup>:1483.
  14. Cerrato A, Piovesana S, Aita SE, Cavaliere C, Felletti S, Laganà A, et al. Detailed investigation of the composition and transformations of phenolic compounds in fresh and fermented *Vaccinium floribundum* berry extracts by high-resolution mass spectrometry and bioinformatics. *Phytochem Anal.* junio de 2022;33<sup>4</sup>:507-16.
  15. Alarcón-Barrera KS, Armijos-Montesinos DS, García-Tenesaca M, Iturralde G, Jaramilo-Vivanco T, Granda-Albuja MG, et al. Wild Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth) and Andean blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth) from the Highlands of Ecuador: Nutritional composition and protective effect on human dermal fibroblasts against cytotoxic oxidative damage. *J Berry Res.* 3 de agosto de 2018;8<sup>3</sup>:223-36.

16. Cereceres Aragón A, Rodríguez Tadeo A, Álvarez Parrilla E, Rodrigo García J. Ingestión de compuestos fenólicos en población adulta mayor. *Nutr Hosp* [Internet]. 2018 [citado 10 de diciembre de 2023]; Disponible en: <https://www.nutricionhospitalaria.org/articulos/02171/show>
17. Ramos A, Visozo A, Piloto J, García A, Rodríguez CA, Rivero R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* agosto de 2003;87<sup>2-3</sup>:241-6.
18. Aguilera-Ortíz A, Alanis-Guzmán M, García-Díaz C, Hernández-Brenes C. Characterisation and stability of Mission variety fig anthocyanins. *Mission Universidad y Ciencias.* 2009;25<sup>2</sup>:151-8.
19. Kuti JO, Konuru HB. Antioxidant Capacity and Phenolic Content in Leaf Extracts of Tree Spinach (*Cnidoscolus* spp.). *J Agric Food Chem.* 14 de enero de 2004;52<sup>1</sup>:117-21.
20. Prencipe FP, Bruni R, Guerrini A, Rossi D, Benvenuti S, Pellati F. Metabolite profiling of polyphenols in *Vaccinium* berries and determination of their chemopreventive properties. *J Pharm Biomed Anal.* febrero de 2014;89:257-67.
21. Rojas-Ocampo E, Torrejón-Valqui L, Muñoz-Astecker LD, Medina-Mendoza M, Mori-Mestanza D, Castro-Alayo EM. Antioxidant capacity, total phenolic content and phenolic compounds of pulp and bagasse of four Peruvian berries. *Heliyon.* agosto de 2021;7<sup>8</sup>:e07787.



**MASED**  
REPRESENTACIONES SAC

**DESCUBRE  
LO QUE  
PODEMOS  
HACER POR TI**

MASED REPRESENTACIONES SAC es una empresa dedicada a la comercialización de equipos e insumos de laboratorio, formada por profesionales con experiencia en las áreas de laboratorio.

Representamos a las más prestigiosas marcas de equipos de laboratorio e insumos, todo lo que necesita para sus proyectos y equipamiento lo puede encontrar con nosotros.



 (511) 423 3900  976 838 048  961 900 112  /masedperu  /Mased\_representaciones

 Av. Universitaria Sur N° 1091-1097 – Lima  infoventas@masedperu.com  www.masedperu.com

# COMBUSTIÓN DE HOLLÍN USANDO CATALIZADORES BASADOS EN ÓXIDOS DE NÍQUEL(II) Y CERIO(IV): PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO CINÉTICO

Nelson Arcos<sup>a</sup>, Mario Hurtado Cotillo<sup>a,b</sup>, Rómulo Cruz<sup>a</sup>, Gino Picasso<sup>a</sup>, Rosario López<sup>a,\*</sup>

## RESUMEN

El hollín generado en las arenas de fundición es un impedimento para la reutilización de las arenas debido a su contaminación, por ello la oxidación catalítica es necesaria para incrementar la velocidad de oxidación del hollín a menores temperaturas, mejorando la eficiencia energética y ambiental del proceso de recuperación. Los catalizadores mixtos de NiCe fueron preparados mediante el método de evaporación de solvente en proporciones molares Ni:Ce de 0.5:9.5, 1:9, 5:5, y 9:1 representados como Ni<sub>0.5</sub>Ce<sub>9.5</sub>, Ni<sub>1</sub>Ce<sub>9</sub>, Ni<sub>5</sub>Ce<sub>5</sub> y Ni<sub>9</sub>Ce<sub>1</sub>, respectivamente y los catalizadores máxicos CeO<sub>2</sub> y NiO también fueron preparados por el mismo método. Todas las muestras se caracterizaron mediante diferentes técnicas basadas en su composición química, estructural, morfológica, textural y propiedades redox. Las técnicas de caracterización fueron: sorción de N<sub>2</sub> (método BET), difracción de rayos X (XRD), termogravimetría (TGA), reducción a temperatura programada con H<sub>2</sub> (TPR-H<sub>2</sub>), espectroscopía láser Raman (LRS), y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). La actividad catalítica se evaluó por TGA bajo aire sintético en contacto directo para la combustión del hollín. La calcinación a 800 °C y 600 °C de los catalizadores mixtos mostraron una baja superficie específica (3–74 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) con tamaño promedio de cristalita que variaron con los distintos valores NiCe (9–22 nm). Sin embargo, se observó un incremento en el volumen del poro mesoporoso, un importante parámetro para la oxidación del hollín con aire. Asimismo, los difractogramas de rayos X del catalizador NiCe mostraron una introducción parcial de los iones Ni<sup>2+</sup> a la red de la fluorita del CeO<sub>2</sub> mediante un desplazamiento con respecto a la posición inicial del difractograma del CeO<sub>2</sub>. El catalizador Ni<sub>0.5</sub>Ce<sub>9.5</sub> calcinado a 600 °C obtuvo la mejor actividad catalítica (T<sub>50</sub> = 519.43 °C) comparado con los catalizadores Ni<sub>1</sub>Ce<sub>9</sub>, Ni<sub>5</sub>Ce<sub>5</sub> y Ni<sub>9</sub>Ce<sub>1</sub> and CeO<sub>2</sub> calcinados a 800 °C y 600 °C. Se evaluó la cinética de oxidación del hollín, donde se determinó la energía de activación (E<sub>a</sub>) tanto para el hollín catalizado como para el no catalizado bajo TGA con flujo de aire y se concluyó que el catalizador Ni<sub>0.5</sub>Ce<sub>9.5</sub> (600) mejoró efectivamente la actividad catalítica (E<sub>a</sub> = 73 kJ mol<sup>-1</sup>) generando la eliminación del hollín a una temperatura más baja.

**Palabras clave:** Hollín, catalizador mixto, evaporación de solvente, cinética.

<sup>a</sup> GI TecMARA, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Tupac Amaru 210, Rímac 15333, Perú, [rclopez@uni.edu.pe](mailto:rclopez@uni.edu.pe)

<sup>b</sup> Facultad de Ingeniería de Petróleo, Gas natural y Petroquímica, Universidad Nacional de Ingeniería

## COMBUSTION OF SOOT FROM FOUNDRY SANDS USING BULK CATALYSTS BASED ON NICKEL (II) AND CERIUM (IV) OXIDES: PREPARATION, CHARACTERIZATION, AND KINETIC STUDY

### ABSTRACT

The soot generated in foundry sands is an impediment to the reuse of the sands due to its contamination, therefore catalytic oxidation is necessary to increase the rate of soot oxidation at lower temperatures, improving the energy and environmental efficiency of the recovery process. NiO-CeO<sub>2</sub> mixed oxides catalysts were prepared by solvent evaporation method with Ni:Ce molar ratios of 0.5:9.5, 1:9, 5:5, and 9:1, represented as Ni<sub>0.5</sub>Ce<sub>9.5</sub>, Ni<sub>1</sub>Ce<sub>9</sub>, Ni<sub>5</sub>Ce<sub>5</sub> y Ni<sub>9</sub>Ce<sub>1</sub>, respectively and the precursors as CeO<sub>2</sub> and NiO catalyst were also prepared through the same method. All the samples were characterized by different techniques based on their chemical, structural, morphological, textural composition, and redox properties. Characterization techniques were N<sub>2</sub> sorption (BET method), X-ray diffraction (XRD), thermogravimetric analysis (TGA), H<sub>2</sub> temperature programmed reduction (TPR-H<sub>2</sub>), Raman laser spectroscopy (LRS), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The catalytic activity of the catalysts was evaluated by TGA under synthetic air as feed gas under tight contact for soot combustion. Calcinations at 800°C and 600°C of the mixed catalysts showed a low specific surface area (3–74 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) with average crystallite sizes that varied with the different NiCe values (9–22 nm). However, an increase in the volume of the mesoporous pore was observed, an important parameter for the oxidation of soot with air. Likewise, the X-ray diffractograms of the NiCe catalysts showed a partial introduction of the Ni<sup>2+</sup> ions to the CeO<sub>2</sub> fluorite lattice through a displacement with respect to the initial position of the CeO<sub>2</sub> diffractogram. The catalyst Ni<sub>0.5</sub>Ce<sub>9.5</sub> (600), obtained the best catalytic activity (T<sub>50</sub> = 519.43 °C) compared to the catalysts Ni<sub>1</sub>Ce<sub>9</sub>, Ni<sub>5</sub>Ce<sub>5</sub> y Ni<sub>9</sub>Ce<sub>1</sub> and CeO<sub>2</sub> calcined at 800 °C and 600 °C. The soot oxidation kinetics were reported, where the activation energy (E<sub>a</sub>) was determined, both for catalyzed and non-catalyzed soot under TGA with air flow. Therefore, it was concluded that the catalyst Ni<sub>0.5</sub>Ce<sub>9.5</sub> (600) effectively improved the catalytic activity of the catalyst (E<sub>a</sub> = 73 kJ mol<sup>-1</sup>) and reduced the combustion temperature, which generates the removal of soot at a lower temperature.

**Keywords:** soot; mixed oxides; solvent evaporation, kinetic

### INTRODUCCIÓN

En el siglo XXI, la preocupación principal de la comunidad científica es la lucha que existe contra la contaminación del aire causada por las emisiones de contaminantes generadas por varias fuentes, las cuales están relacionadas a las emisiones de compuestos perjudiciales para la salud como la generación de material carbonoso particulado (PM 2.5) mayoritariamente compuesto de hollín, estas partículas de hollín son formadas como sub-productos no deseados que, en particular, son emitidos de la combustión interna incompleta en motores junto con NO<sub>x</sub>, CO e hidrocarburos<sup>1</sup>. Las fuentes que producen altamente estos contaminantes son los vehículos, barcos, máquinas industriales, las industrias, etc. Estos contaminantes han sido relacionados con las enfermedades



respiratorias, cáncer, problemas de memoria a corto plazo, disminución del coeficiente intelectual (IQ) e incluso pueden contribuir con los defectos de nacimiento<sup>2</sup>.

El impacto negativo causado por estos tipos de contaminantes ha permitido que investigadores desarrollen innovaciones con nuevos métodos sintéticos que sean más económicos y no contaminantes que puedan trabajar bajo condiciones razonables para reducir estas emisiones de hollín. Las actuales tecnologías están basadas en una combinación de filtros (filtros particulados de diesel, DPF) y materiales catalíticos<sup>3</sup>. El objetivo de estas nuevas tecnologías ayudará con la eliminación eficiente de los problemas relacionados a la emisión partícula-hollín. El atrapamiento de hollín mediante filtros (DPF) es una buena manera de disminuir la emisión de hollín de los gases de escape, sin embargo, se necesita una regeneración periódica de estos filtros para evitar que se bloqueen o se dañen. Durante la regeneración, se incrementa la temperatura del filtro ya que el hollín se oxida a altas temperaturas (alrededor de 600-700 °C) y esto requiere un ingreso de energía significativo<sup>4</sup>. Las altas temperaturas que se necesitan para la regeneración de filtros no catalizados generalmente se consiguen por inyección de diésel o por gasolina hacia el sistema de escape. Generalmente, el rango de temperatura del sistema de escape es de alrededor de 600-800 °C para gasolina y 150-500 °C para diésel. Esta estrategia conduce a un fenómeno exotérmico incontrolable, lo cual puede dañar el filtro, siendo esto una desventaja<sup>5</sup>. Recientemente, se han hecho mejoramientos significativos equipando los sistemas de escape con un convertidor catalítico. Los catalizadores de metales nobles (Pt, Pd y Rh) han sido los más usados debido a su actividad y durabilidad, sin embargo, estos metales nobles son muy caros y su uso es limitado en la reacción de oxidación catalítica del hollín<sup>4</sup>. Por lo tanto, es de gran interés el desarrollo de catalizadores efectivos y activos que puedan incrementar significativamente la velocidad de oxidación de hollín. Investigadores han reportado varios tipos de catalizadores que muestran una buena actividad catalítica para la oxidación del hollín, estos catalizadores incluyen óxidos de metales<sup>6</sup>, óxidos de metales mixtos combinados con metales nobles<sup>7</sup>, perovskita<sup>8</sup>, óxidos de metales de transición<sup>9</sup>, catalizadores modificados con tierras raras<sup>10</sup> y metales nobles<sup>11</sup>. Los catalizadores de ceria y basados en ceria (mixtos) han adoptado ampliamente este propósito, por lo cual, investigadores han estudiado y reportado estos sistemas en varias investigaciones de oxidación del hollín<sup>3</sup>. Los catalizadores basados en ceria son considerados buenos catalizadores para la oxidación del hollín debido principalmente a su alta capacidad de almacenamiento de oxígeno y por sus propiedades redox (disponibilidad de cambiar de  $Ce^{4+}$  a  $Ce^{3+}$ )<sup>10</sup>. Sin embargo, existe una pérdida de la capacidad de almacenamiento de oxígeno de la ceria cuando está a altas temperaturas, ocasionando una pérdida de actividad por la sinterización de las partículas y el crecimiento de los granos<sup>12</sup>. Por lo tanto, es ampliamente investigado y requerido el desarrollo de catalizadores avanzados con resistencia térmica mejorada para la sinterización y una alta capacidad de almacenamiento de oxígeno. La actividad catalítica de la ceria puede mejorarse tras el dopamiento de la ceria con distintos elementos dentro de su red cristalina, es decir, se debe aprovechar la fuerte interacción que existen entre óxidos de metales distintos. Se han usado diferentes heteroátomos para dopar la ceria y así modificar sus propiedades químicas y mejorar la actividad catalítica y estabilidad térmica; entre ellos tenemos al Zr y metales de tierras raras (La y Pr)<sup>13,14</sup>, metales de transición (Cu, Co, Mn, Cr y Fe)<sup>15,16</sup>, metales alcalinos y alcalinos térreos (K, Cs, Na, Ca, Ba y Mg)<sup>17</sup>, y metales nobles (Ag, Au, Pd, Ru y Rh)<sup>18,19</sup>, con los cuales se ha obtenido materiales con mejor rendimiento oxidativo. Liu et al.<sup>20</sup> ha analizado el comportamiento catalítico en la combustión de

hollín de diferentes sistemas de ceria dopados, ellos concluyeron que las actividades de oxidación del hollín de los catalizadores siguen el siguiente orden: metales alcalinos > metales de transición  $\geq$  metales nobles >  $\text{CeO}_2$  dopado con Zr y tierras raras en condiciones catalíticas tanto en  $\text{O}_2$  como en  $\text{NO} + \text{O}_2$ . Sin embargo, catalizadores de ceria modificados con metales alcalinos generalmente son térmicamente inestables debido a su naturaleza volátil de los metales alcalinos<sup>21</sup>, y los catalizadores de ceria modificados con metales nobles tienen un costo restringido. Por lo tanto, los metales de transición y metales de tierras raras, especialmente  $\text{Ce}_x\text{Zr}_{1-x}\text{O}_2$ , son las mejores opciones en términos de actividad, estabilidad térmica y eficiencia de costo<sup>22</sup>. Aberkane et al.<sup>3</sup> estudiaron el efecto del pH en la estructura y propiedades de una serie de óxidos mixtos de  $\text{NiO-CeO}_2$  y relacionaron la estructura de los óxidos con la actividad catalítica en la oxidación del hollín. Sus catalizadores fueron preparados por el método de coprecipitación modificada en distintos valores de pH, la actividad catalítica de estos catalizadores fue bajo condiciones de contacto rígido y ligero. Su mejor performance catalítico fue con Ni-Ce-8 (pH = 8) en contacto rígido (catalizador-hollín) y en atmósfera de aire/ $\text{N}_2$  ( $T_{50} = 417$  °C). Sellers-Anton et al.<sup>23</sup> sintetizaron un catalizador macroporoso de orden tridimensional (3DOM)  $\text{NiO-CeO}_2$  por infiltración de Ni sucesiva para mejorar la generación del oxígeno activo por modificación con NiO y transferir este oxígeno activo desde el catalizador hacia las partículas de hollín. Su mejor performance catalítico fue con (Ni-Ce)-3DOM en presencia del 5%  $\text{O}_2$  en  $\text{N}_2$  ( $T_{50} = 530.2$  °C). Reportes previos, demuestran el potencial del compuesto  $\text{NiO/CeO}_2$  para funcionar como un catalizador eficiente de oxidación del hollín a baja temperatura, sin embargo, estos métodos de preparación, son complicados y, por lo tanto, difíciles de implementar a grandes escalas. Bajo este contexto, en este trabajo, se han preparado catalizadores mixtos  $\text{NiO-CeO}_2$  a distintas proporciones molares (1, 5 y 9) mediante el método de evaporación de solvente para elegir el catalizador con mejor performance catalítico y poder hacer un estudio cinético no mecanístico evaluando la energía de activación ( $E_a$ ) de este mediante las curvas light off.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reactivos

Para la preparación de los catalizadores mixtos de níquel (NiO) y cerio ( $\text{CeO}_2$ ), por el método de evaporación de solvente, se utilizaron la sal de nitrato de níquel (II) hexahidratado,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 99% de pureza en la marca EMSURE MERCK y sal de nitrato de cerio(III) hexahidratado,  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 99% de pureza en la marca EMSURE MERCK y agua ultrapura MilliQ 18.2  $\text{M}\Omega$  cm at 298 K.

### Síntesis de catalizadores basados en óxidos mixtos de níquel y cerio (Ni-Ce)

Para la preparación de los catalizadores de óxido mixto NiCe mediante el método de evaporación de solvente, se adicionaron distintas soluciones acuosas de las sales de níquel y cerio para obtener diferentes relaciones molares de catalizadores Ni:Ce en un volumen total de 50 mL (**Tabla 1**) donde cada catalizador mixto, se disolvió con agua desionizada bajo agitación constante a 80 °C durante 24 h. Luego, se secaron estos catalizadores mixtos a 50 °C durante 24 h. Finalmente, se calcinaron a 600 y 800 °C por 4 h con una rampa de calentamiento de 2 °C  $\text{min}^{-1}$ .

**Tabla 1.** Masas obtenidas para la síntesis de catalizadores de óxidos mixtos Ni y Ce por el método de evaporación de solvente

Catalizador	Cantidad molar de Ni-Ce (0.25M) en 50 mL		Masa de las sales precursoras (g)		%Ni peso (%p/p)
	Ni	Ce	Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Ce(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	
Ni <sub>0.5</sub> Ce <sub>9.5</sub>	0.000625	0.011875	0.1818	5.1564	3
Ni <sub>1</sub> Ce <sub>9</sub>	0.0025	0.0225	0.7270	9.7699	7
Ni <sub>9</sub> Ce <sub>1</sub>	0.0225	0.0025	6.5432	1.0856	86
Ni <sub>5</sub> Ce <sub>5</sub>	0.0125	0.0125	3.6351	5.4278	40

### Caracterización

Las caracterizaciones realizadas a los catalizadores de óxidos NiCe fueron mediante análisis de difracción de rayos X (XRD) que nos mostró la presencia de las fases cristalinas en los catalizadores mixtos de óxidos de NiCe. El equipo de difracción de rayos X utilizado fue un D2-PHASER BRUKER. La radiación utilizada fue correspondiente a la transición de CuK $\alpha$  ( $\lambda = 0.154184$  nm) y el rango angular ( $2\theta$ ) utilizado fue  $10^\circ \leq 2\theta \leq 60^\circ$  a 0.050 °/s, 30 kV y 10 mA. El análisis de sorción de N<sub>2</sub> (método BET) se utilizó para hallar las propiedades texturales de los catalizadores (área superficial, tamaño de poro, etc), el equipo utilizado fue el equipo Micromeritics GEMINI-VII serie t. Se utilizó gas N<sub>2</sub> como gas de análisis (99% de pureza) y como refrigerante se utilizó nitrógeno líquido, este refrigerante se utilizó para la condensación del N<sub>2</sub>. Antes de analizar nuestros catalizadores mediante esta técnica, se degasificaron bajo He a 250 °C durante 2 h para eliminar componentes adsorbidos físicamente y otros gases adsorbidos en la superficie de los catalizadores. Para el cálculo del área BET, el rango de presiones p/p<sub>0</sub> trabajados fue de 0.05 a 0.30, esto asigna a la adsorción de una monocapa. El software utilizado para medir los puntos de equilibrio fue gas micromeritics, con un total de 50 puntos en el rango:  $0.09 \leq p/p_0 \leq 0.98$ . El tiempo de equilibrio en cada punto fue de 5 s. Se utilizó el método de Brunauer-Emmett-Teller (BET) para calcular el área superficial de los catalizadores. El análisis de termogravimetría (TGA) a los catalizadores se realizan con el fin de determinar las condiciones térmicas de preparación de estos, tanto másicos como mixtos. Se tomaron los catalizadores en su etapa seca para evaluar las etapas de descomposición de cada proceso y de esta manera, se determinó la temperatura óptima de calcinación de los catalizadores. El equipo utilizado fue un Perkin Elmer Simultaneous Thermal Analyzer (STA 6000). Las condiciones de análisis para estos catalizadores fueron a una rampa de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup>, a una velocidad de flujo de 20 mL min<sup>-1</sup> en aire y a un rango de temperatura de 35-800 °C. El análisis de reducción a temperatura programada con H<sub>2</sub> (TPR-H<sub>2</sub>) fue para evaluar la reducibilidad de los catalizadores. El equipo utilizado fue un equipo TPR Chemisorb 2720 Micromeritics equipado con un detector de termoconductividad (TCD). Las condiciones de trabajo estuvieron bajo un flujo gaseoso mixto del 10% H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> (25 mL min<sup>-1</sup>) y una velocidad de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup>, en un rango de temperatura desde 25 °C a 800 °C. La espectroscopía Láser Raman (LRS) brinda información sobre la estructura del catalizador (defectos) tanto en el bulk como en la superficie, así como la presencia de adsorbatos e intermediarios de reacción. Esta técnica es una herramienta poderosa para el estudio de los materiales catalíticos incluyendo los procesos químicos de caracterización que ocurren en la superficie activa. Los espectros Raman fueron medidos a temperatura

ambiente con un espectrómetro Horiba Scientific, con un láser de 532 nm, aplicando una potencia de 10%. La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) es una técnica utilizada ampliamente en la caracterización de las superficies de los materiales. Esta técnica es adecuada para probar el efecto que tiene un segundo metal agregado en un catalizador mixto en la superficie química del CeO<sub>2</sub>, la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se utilizó para identificar los grupos funcionales presentes en la superficie de los catalizadores preparados. El equipo utilizado fue un FTIR–Alpha Fourier Transform Infrared Spectrometer–Bruker sobre 60 barridos (scan) para mejorar la relación señal–ruido en un rango de longitud de onda entre 2500 y 400 cm<sup>-1</sup>.

### Actividad catalítica

Para el estudio de la actividad catalítica, se utilizó como modelo de hollín al carbón oscuro de marca Micromeritics, número de parte 004-16833-00 y número de lote D-7, ya que sus propiedades son similares a las partículas de hollín. El test catalítico se midió con un tipo de contacto específico a la mezcla catalizador-hollín (contacto directo, *tight contact*), este tipo de contacto consistió en moler la mezcla catalizador-hollín durante 10 min en un mortero, la mezcla de proporción catalizador:hollín fue de 1:10 (p/p), respectivamente. Las medidas catalíticas de las mezclas se realizaron por análisis termogravimétrico (TGA, Perkin Elmer Simaltenous Thermal Analyzer, STA 6000), calentando desde temperatura ambiente hasta los 850 °C, bajo un flujo de aire con 15 mL min<sup>-1</sup> de flujo de O<sub>2</sub> (flujo total de 50 mL min<sup>-1</sup>).

### Estudio cinético

El estudio cinético de los catalizadores de óxidos mixtos NiCe frente al hollín, se llevó a cabo tras la evaluación de la rampa de calentamiento en el TGA (Perkin Elmer Simaltenous Thermal Analyzer, STA 6000), es decir, el modo rampa consistió en evaluar los análisis termogravimétricos de los catalizadores a distintas rampas constantes de calentamiento de 10, 15, 20 y 25 °C min<sup>-1</sup> en aire con un flujo del 30% O<sub>2</sub> como gas oxidante (50 mL min<sup>-1</sup>). El modo rampa principalmente se llevó a cabo para evaluar el rendimiento catalítico basado en la temperatura donde la mitad del hollín ha sido combustionado (T<sub>50</sub>). La conversión y velocidad de reacción se calcularon de la siguiente manera<sup>26</sup>:

$$X = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \quad (1)$$

Donde:

X: Conversión de oxidación del hollín, m<sub>0</sub>: Peso inicial del hollín, m<sub>t</sub>: Peso restante del hollín en el tiempo t, La velocidad de reacción, r<sub>s</sub>, fue descrita como la pérdida de masa restante de carbono por unidad de tiempo t.

$$r_s = \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

La velocidad de oxidación para este tipo de reacción puede ser expresado como:

$$\frac{dX}{dT} = \left(\frac{A}{\beta}\right) \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) f(X) \quad (3)$$

$$\beta = \frac{dT}{dt} \quad (4)$$

Donde:

T = Temperatura absoluta, X = Conversión de oxidación del hollín, β = Rampa de calentamiento, f(X) = Modelo de conversión, R = Constante universal de los gases, A y

$E_a$  = Parámetros de Arrhenius, factor pre-exponencial y la energía de activación, respectivamente.

La función  $f(X)$  es la dependencia de la velocidad en la fracción del sólido que permanece invariable a medida que avanza la reacción. Por último, en base al modelo Kissinger-Akahira-Sunose (KAS), la ecuación (3) puede ser integrada y obtener la siguiente ecuación:

$$\ln\left(\frac{\beta}{T^2}\right) = \ln\left[\frac{AE_a}{Rg(X)}\right] - \frac{E_a}{RT} \quad (5)$$

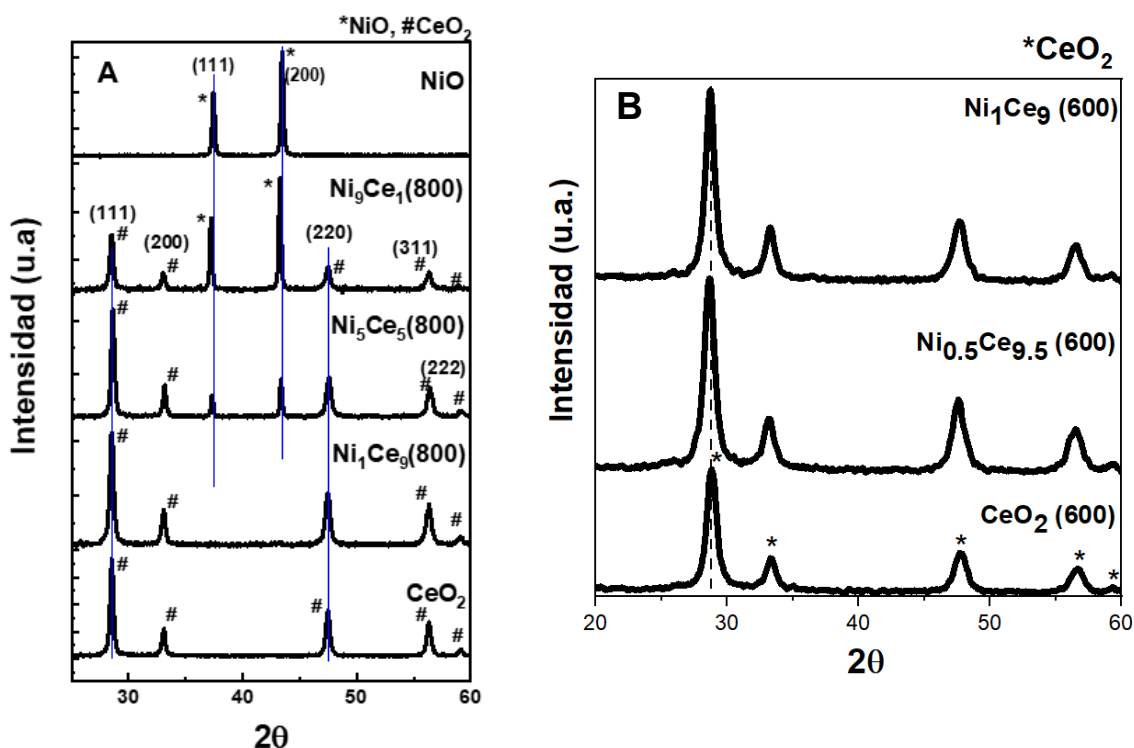
Este modelo de análisis generalmente asume que el modelo conversión es invariante para todas las curvas de oxidación de TGA consideradas<sup>26</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

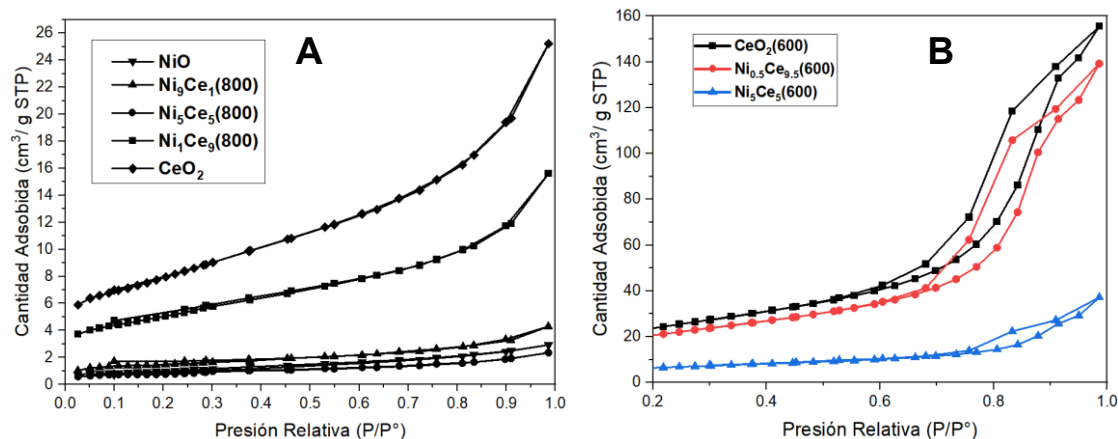
### Caracterización

La **Figura 1** muestra los difractogramas de los catalizadores básicos y mixtos de níquel y cerio calcinados a 600 y 800 °C. El difractograma del  $\text{CeO}_2$  mostró la presencia de la fase fluorita con estructura cristalina cúbica centrada en las caras en los picos de difracción de  $2\theta = 28.59^\circ, 33.13^\circ, 47.56^\circ, 56.43^\circ$  y  $59.18^\circ$ , correspondientes a los planos cristalinos (111), (200), (220), (311) y (222), respectivamente<sup>1</sup>. El difractograma del NiO mostró la presencia de la fase cúbica con picos de difracción en  $2\theta = 37.3^\circ$  y  $43.36^\circ$ , correspondientes a los planos cristalinos (111) y (200), respectivamente<sup>3</sup>. En el caso de los catalizadores  $\text{Ni}_x\text{Ce}_{10-x}$  (800), solamente se detectaron menores intensidades en las líneas de difracción atribuidas al  $\text{CeO}_2$  para  $\text{Ni}_1\text{Ce}_9$  (800). Además, no se detectaron los picos de difracción del NiO en el catalizador  $\text{Ni}_1\text{Ce}_9$  (800), debido a que se introdujo especies de Ni a la red de la fluorita de la ceria, formando un sólido compacto<sup>27</sup>. Otra evidencia de la incorporación de los iones  $\text{Ni}^{2+}$  a la red del  $\text{CeO}_2$  es que el pico de los catalizadores mixtos NiCe relacionado al  $\text{CeO}_2$  presenta un ligero desplazamiento con respecto a la posición inicial del pico del  $\text{CeO}_2$  (800),  $2\theta = 28.52^\circ$ . De la misma forma, los catalizadores calcinados a 600 °C presentan el ligero desplazamiento hacia la izquierda comparada con el pico del  $\text{CeO}_2$  (600) como se muestra en la **Figura 1B**. Los catalizadores mixtos  $\text{Ni}_5\text{Ce}_5$  y  $\text{Ni}_9\text{Ce}_1$  presentaron picos de difracción de ambas fases, esto indicó que con el incremento del contenido de NiO, a parte de los iones  $\text{Ni}^{2+}$  ingresados a la red de la ceria, una parte de los iones  $\text{Ni}^{2+}$  se cristalizaron en su superficie<sup>27</sup>. Esta introducción de iones  $\text{Ni}^{2+}$  sugiere que se ha formado una buena estructura sólida en  $\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}$  (600), insertando iones  $\text{Ni}^{2+}$  dentro de la red cristalina del  $\text{CeO}_2$ . El incremento en el valor del parámetro de red de los catalizadores  $\text{Ni}_x\text{Ce}_{(10-x)}$  es debido a la cristalización de parte de los iones  $\text{Ni}^{2+}$  en la superficie de la ceria<sup>28</sup>. Adicionalmente, la introducción de iones  $\text{Ni}^{2+}$  es muy ventajosa para obtener una reducción en el tamaño de cristalita determinado del pico de difracción del plano (111) por la ecuación de Debye-Scherrer. En general, el tamaño de cristalita de estas soluciones sólidas que contienen ceria son más pequeñas que el  $\text{CeO}_2$ , en particular, el catalizador  $\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}$  (600) tiene el tamaño de cristalita más pequeño entre todos los catalizadores estudiados. Este fenómeno evita el crecimiento de la estructura de fase cúbica<sup>29</sup> y es debido a un incremento de iones  $\text{Ce}^{3+}$  en la superficie, lo cual contribuye a la adsorción de especies de oxígeno y como consecuencia, promueve la actividad catalítica<sup>30</sup>.

La **Figura 2A** muestra las isotermas de adsorción de  $N_2$  para los catalizadores  $Ni_xCe_{10-x}$  calcinados a  $800\text{ }^\circ\text{C}$  con un comportamiento clásico de tipo II. Además, al ser isoterma de tipo II, las curvas de desorción prácticamente coinciden con la trayectoria de adsorción de las respectivas isotermas de sorción de todas las muestras, independientemente de la composición de los catalizadores<sup>31</sup>. Todas las isotermas de adsorción presentaron una inflexión a altas presiones relativas ( $P/P_0 > 0.8$ ), debido al llenado de vacíos de antipartículas (poros secundarios) a través de la condensación capilar de nitrógeno<sup>32</sup>. Sin embargo, se observó en la **Figura 2B** una diferencia significativa con los catalizadores  $Ni_xCe_{10-x}$  calcinados a  $600\text{ }^\circ\text{C}$ , estos son materiales más porosos como lo podemos apreciar en sus isotermas de sorción de  $N_2$  (**Figura 2B**), ya que se aprecia unas isotermas de tipo IV, donde se denota una mayor adsorción de  $N_2$  con sus ciclos de histéresis bien definidos. Por otra parte, comparando las propiedades texturales del soporte ( $CeO_2$ ) y los catalizadores mixtos  $Ni_xCe_{10-x}$ , se observó que la adición de los iones  $Ni^{2+}$  en la estructura del soporte  $CeO_2$  produce un bloqueo de los microporos y mesoporos, es decir, no se observó una diferencia significativa en la porosidad entre las muestras  $CeO_2$  y  $Ni_xCe_{10-x}$  tanto para las calcinaciones a  $800\text{ }^\circ\text{C}$  y a  $600\text{ }^\circ\text{C}$  (**Tabla 2**).



**Figura 1.** Difractogramas de rayos X para catalizadores mixto  $Ni_xCe_{10-x}$  calcinados a (A)  $800\text{ }^\circ\text{C}$  y (B)  $600\text{ }^\circ\text{C}$



**Figura 2.** Isotermas de sorción de  $N_2$  de los catalizadores  $Ni_xCe_{10-x}$  calcinados a (A) 800 °C y a (B) a 600 °C

Este hecho denota que el área superficial de estos materiales es lo suficientemente alta para dispersar las partículas de óxido de níquel sin bloquear la entrada de los poros medidos por la adsorción de  $N_2$ <sup>23</sup>. Además, de acuerdo con los isotermas de sorción de  $N_2$ ,  $Ni_{0.5}Ce_{9.5}(600)$  es el único catalizador con los mesoporos más desarrollados (11 nm, **Tabla 2**).

**Tabla 2** Propiedades texturales de los catalizadores  $Ni_xCe_{10-x}(T)$ , donde x: proporción molar Ni y T: temperatura de calcinación del catalizador

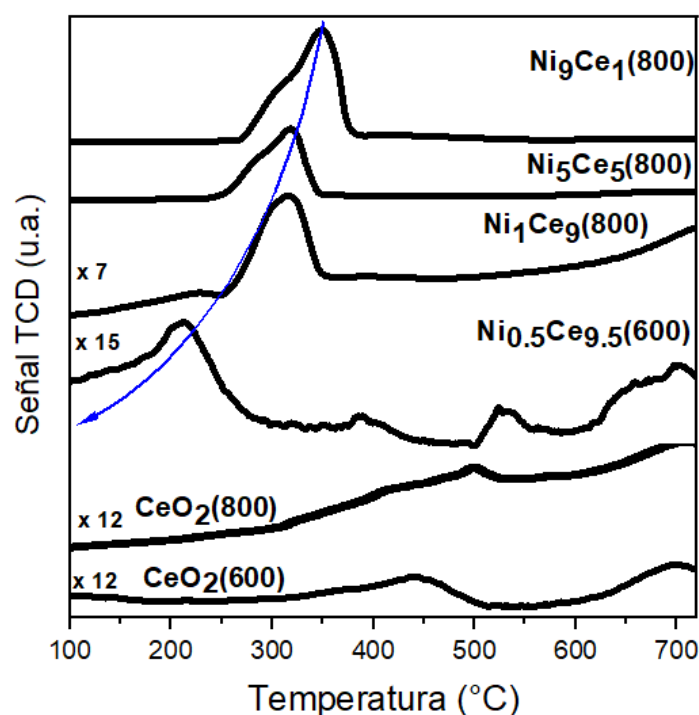
Muestra	Área superficial, $S_{BET}$ ( $m^2 g^{-1}$ )	Diámetro promedio de poro BJH (nm)	Tamaño de cristalita (nm)
$Ni_9Ce_1(800)$	5	2	20
$Ni_5Ce_5(800)$	3	3	22
$Ni_1Ce_9(800)$	18	3	18
$Ni_5Ce_5(600)$	23	10	10
$Ni_{0.5}Ce_{9.5}(600)$	74	11	9
$CeO_2(600)$	85	10	10
$CeO_2(800)$	28	3	21

Se estudió la descomposición térmica de los catalizadores NiCe en su forma de sal, es decir, el proceso de evaporación de solvente de la mezcla de sales precursoras a distintas proporciones molares en base al níquel (Sal  $Ni_{0.5}Ce_{9.5}$ , Sal  $Ni_1Ce_9$  y Sal  $Ni_5Ce_5$ ). Este estudio termogravimétrico se evaluó desde 25 °C hasta los 800 °C bajo un flujo de aire sintético (Figura no mostrada). En general, la evolución térmica de estas sales catalizadoras NiCe involucraron tres pasos principales de pérdida de masa durante la descomposición hasta los 600 °C. Para temperaturas mayores a los 600 °C no se observó pérdida de masa, por lo tanto, los resultados de TGA para estas sales  $Ni_xCe_{10-x}$  muestran que la temperatura apropiada para su calcinación es a los 600 °C debido a que a esta temperatura es lo suficientemente alto para la eliminación de agua, carbonatos y nitratos<sup>24</sup>. Adicionalmente, se evaluó una calcinación de 800 °C para estos catalizadores con la finalidad de apreciar las diferencias significativas que ocurren tanto en la

superficie, en la adsorción de las moléculas de oxígeno, en el tamaño de sus parámetros de red, etc. para estas distintas temperaturas de calcinación.

La reducibilidad de un catalizador es un parámetro muy importante que está relacionado con su actividad en la reacción de oxidación del hollín. Los perfiles de TPR-H<sub>2</sub> son mostrados en la **Figura 3** para catalizadores Ni<sub>x</sub>Ce<sub>10-x</sub> calcinados a 800 y 600 °C. En el caso del CeO<sub>2</sub> (600), el pico de reducción de H<sub>2</sub> fue menor (440 °C). La introducción de níquel a la red de la ceria mejoró la reducibilidad, es decir, todos los perfiles de los catalizadores de óxidos mixtos mostraron picos principales de reducción asimétricos en el rango de 200-400 °C lo cual podría proporcionar más oxígeno reticular generando una velocidad de combustión más rápida debido al mayor aumento en la cantidad de oxígeno activo disponible<sup>33</sup>, siendo el Ni<sub>0.5</sub>Ce<sub>9.5</sub>(600) el catalizador mixto con la reducibilidad más baja (205 °C), lo cual se debe a la formación de una estructura de solución sólida (combinación de los precursores de Ni y Ce que al ser fundidos a alta temperatura y luego de enfriarse forman este nuevo sólido) causada por la introducción completa del Ni dentro de la red cristalina del CeO<sub>2</sub><sup>33</sup>. Además, es importante notar que no existe señales de consumo de H<sub>2</sub> a temperaturas mayores a 400 °C, lo cual implica que todo el proceso de reducción ocurrió hasta los 400 °C, incluyendo la reducción del CeO<sub>2</sub><sup>25</sup>.

La espectroscopía láser Raman es una técnica muy apropiada para la caracterización estructural de óxidos a base de cerio. La técnica XRD nos brinda información principalmente en relación con la posición de los cationes grandes en la red cristalina, tales como el cerio. Sin embargo, esta técnica ofrece una sensibilidad muy baja respecto a los elementos ligeros como el oxígeno<sup>34</sup>. La espectroscopía Raman nos brinda información sobre la red de aniones, por lo que la técnica de XRD no es muy sensible.



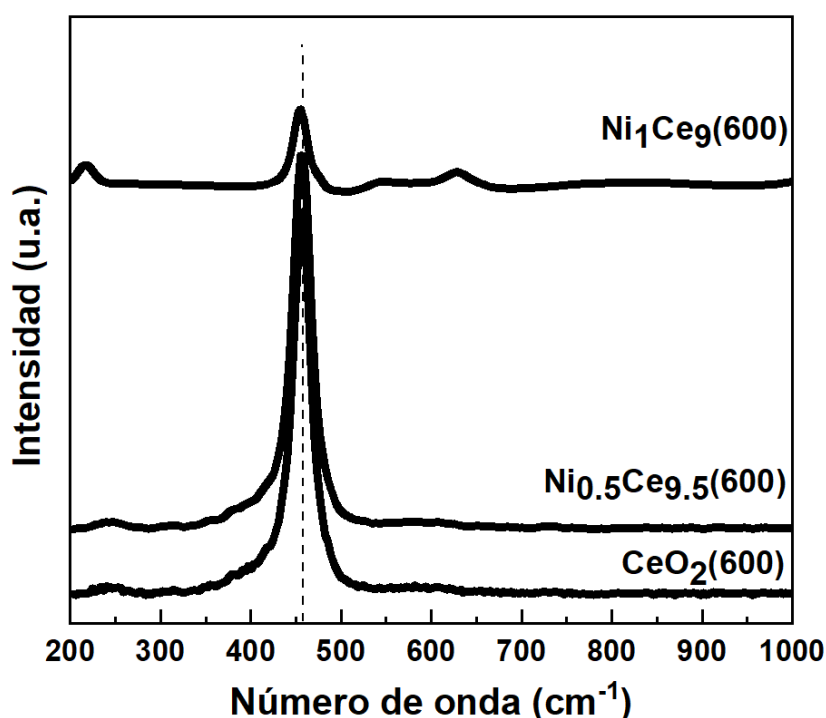
**Figura 3.** Perfiles de reducción a temperatura programada con H<sub>2</sub> (TPR-H<sub>2</sub>) de catalizadores mixtos Ni<sub>x</sub>Ce<sub>10-x</sub> calcinados a 600 y 800 °C.

En este sentido, esta técnica revela la presencia de defectos en este sistema y la disposición de los enlaces Metal-Oxígeno (M-O). La Figura 4 muestra los espectros



Raman de los catalizadores  $\text{Ni}_x\text{Ce}_{10-x}$  calcinados a  $600\text{ }^\circ\text{C}$ . Para el  $\text{CeO}_2$ , los resultados mostraron un espectro característico de una banda muy intensa alrededor de  $458\text{ cm}^{-1}$ , esta banda definida es atribuida al modo de vibración del enlace Ce-O activo en Raman (modo  $\text{F}_{2g}$ ) de la estructura cúbica tipo fluorita en la que cristaliza este óxido, correspondiendo a un modo de vibración simétrica de los átomos de oxígeno que rodean a los cationes de cerio<sup>34</sup>. Para los catalizadores mixtos  $\text{Ni}_x\text{Ce}_{10-x}$  (600), se mantuvo la banda Raman con el modo de vibración  $\text{F}_{2g}$ , lo cual confirma que estos óxidos mixtos también cristalizan en una estructura cúbica tipo fluorita. Sin embargo, se pueden observar tres efectos en esta banda  $\text{F}_{2g}$  a medida que aumenta la cantidad de níquel en el óxido:

- I. Una disminución en la intensidad de la banda.
- II. Un ensanchamiento de la banda  $\text{F}_{2g}$ .
- III. Un ligero cambio de esta banda  $\text{F}_{2g}$  a números de onda más bajos.



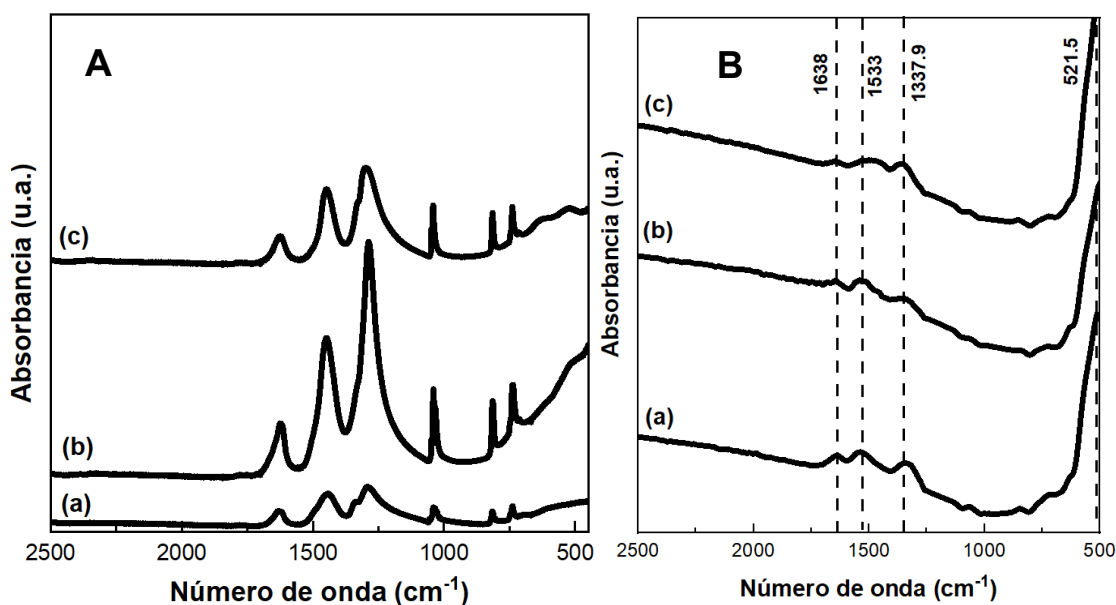
**Figura 4.** Espectros Raman de los catalizadores mixtos  $\text{Ni}_x\text{Ce}_{10-x}$  calcinados a  $600\text{ }^\circ\text{C}$ .

Respecto al efecto de la pérdida de intensidad de la banda  $\text{F}_{2g}$  tras el incremento del níquel, esto es causado por el efecto de pérdida de simetría en la red del  $\text{CeO}_2$  cuando se introduce el níquel. Aquello afecta a la vibración del oxígeno con respecto a su posición de equilibrio<sup>34</sup>. Además, el ensanchamiento de los picos puede ser relacionado a las vacantes de oxígeno<sup>11</sup>. El catalizador  $\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}$ (600) mostró relativamente un gran número de vacantes de oxígeno (Tabla 3). Por último, tras la introducción del níquel a la red del  $\text{CeO}_2$ , promueve un cambio de la banda  $\text{F}_{2g}$  hacia números de onda más bajo, lo cual es consecuencia del aumento en las distancias de enlace M-O<sup>34</sup>. Esto estaría en concordancia con los valores de parámetro de red obtenidos en el estudio por XRD.

**Tabla 3.** Posición del pico  $F_{2g}$ , su ancho completo en la mitad de la máxima (FWHM) de los catalizadores calcinados a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Muestra	Pico $F_{2g}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	FWHM del pico
		$F_{2g}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
$\text{CeO}_2(600)$	456.6	29.8
$\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}(600)$	456.1	30.1
$\text{Ni}_1\text{Ce}_9(600)$	454.6	20.5

Los espectros FTIR de los catalizadores antes de ser calcinados se muestran en la **Figura 5** muestra los espectros FTIR de los catalizadores  $\text{Ni}_x\text{Ce}_{10-x}$  calcinados a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Aproximadamente se observaron las mismas bandas, pero con absorbancias más débiles. Las bandas post-calcinación disminuyeron debido a la eliminación de moléculas de carbonatos, nitratos y agua de la estructura del catalizador<sup>24</sup>. Además, para los catalizadores calcinados, la presencia de bandas de baja frecuencia en  $1638$ ,  $1533$ ,  $1337$  y  $521\text{ cm}^{-1}$  pueden ser atribuidos a las vibraciones que existen entre (M-O) y (M-O-M). Por último, la débil absorbancia e intensidades disminuidas de las bandas indican que la calcinación a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$  condujo a la conversión completa de la estructura del catalizador a óxidos metálicos<sup>24</sup>.



**Figura 5.** Espectros FTIR de los catalizadores  $\text{Ni}_x\text{Ce}_{10-x}$  (A) antes de ser calcinados y (B) a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$  (a)  $\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}$ ; (b)  $\text{Ni}_1\text{Ce}_9$ ; (c)  $\text{Ni}_5\text{Ce}_5$

### Actividad catalítica

Los catalizadores mixtos  $\text{Ni}_x\text{Ce}_{10-x}$  fueron evaluados en la reacción de oxidación catalítica del hollín, además, se realizó la combustión del hollín propio (no catalizado). Las medidas de actividades catalíticas fueron hechas por el método *tight contact* debido a que el modo de contacto en esta reacción es muy importante porque es un factor clave en la reacción. Existen varias razones de porqué la mezcla por contacto directo es más reactiva<sup>35</sup>: (1) El

catalizador tendrá más puntos de contacto con el hollín. (2) Las partículas del catalizador serán más pequeñas y mejor dispersadas. (3) El tipo de contacto controla el mecanismo que está ocurriendo. Todos los perfiles del TGA ( $\text{Ni}_1\text{Ce}_9 + \text{C}$ ,  $\text{Ni}_5\text{Ce}_5 + \text{C}$ ,  $\text{Ni}_9\text{Ce}_1 + \text{C}$  y el hollín no catalizado) fueron normalizados eliminando las respuestas debajo de los 500 °C, debido a la desorción del  $\text{H}_2\text{O}$  adsorbido<sup>34</sup>. La oxidación del hollín frente a los catalizadores mixtos  $\text{Ni}_x\text{Ce}_{10-x}$  calcinados a 800 y 600 °C sus resultados están resumidos en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Temperaturas características de la oxidación del hollín en aire, bajo modo de contacto directo (tight contact) para catalizadores mixtos  $\text{Ni}_x\text{Ce}_{10-x}$

<i>Modo de contacto</i>	<i>Catalizador</i>	<i>T<sub>50</sub>* (°C)</i>
No catalizado	Carbón puro (Printex-U)	677
Directo (Tight)	$\text{Ni}_9\text{Ce}_1(800)$	669
	$\text{Ni}_5\text{Ce}_5(800)$	669
	$\text{Ni}_1\text{Ce}_9(800)$	659
	$\text{Ni}_1\text{Ce}_9(600)$	547
	$\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}(600)$	519

\*Temperatura al 50% de conversión del hollín

Según la Tabla 5, la temperatura  $T_{50}$  calculada para la oxidación del hollín en los catalizadores estudiados siguió la tendencia de: Carbón puro >  $\text{Ni}_9\text{Ce}_1(800) \approx \text{Ni}_5\text{Ce}_5(800) > \text{Ni}_1\text{Ce}_9(800) > \text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}(600)$ . Estos resultados para la oxidación del hollín en base a catalizadores Ce son mejores que otras referencias encontradas, por ejemplo, Rangaswamy<sup>37</sup>. En este caso, las partículas de Ni y la temperatura de calcinación de los catalizadores presentan un gran rol en la disminución del  $T_{50}$  y el incremento de la actividad catalítica. Wen<sup>38</sup> indicó que el área superficial y la estructura mesoporosa de los materiales cumplen un rol importante en el mejoramiento de contacto entre el hollín y los sitios activos del catalizador. En este trabajo de investigación, la estructura mesoporosa de nuestros catalizadores calcinados a 600 °C dieron lugar a la actividad más alta. Además, otro factor que predomina en el contacto directo es la cantidad de especies de oxígeno activo en la superficie<sup>21</sup>. Como se observó en los resultados del TPR- $\text{H}_2$ , es posible crear especies de oxígeno muy reactivos en los óxidos mixtos de cerio y níquel debido al efecto sinérgico causado por la incorporación del Ni dentro de la red del  $\text{CeO}_2$ <sup>35</sup>, es decir, la incorporación del Ni a la estructura del  $\text{CeO}_2$  resultó mejores resultados que los efectos individuales de cada uno de ellos. Por lo tanto, en base a los resultados, el catalizador  $\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}(600)$  es el catalizador mixto con mayor actividad catalítica debido a la incorporación del níquel a la red del  $\text{CeO}_2$ .

### Estudio cinético

En el análisis cinético debemos tener en cuenta que, durante una reacción química, lo primero que se forma es un estado de transición, donde la energía de activación ( $E_a$ ) se forma tras la diferencia de energía entre el estado de transición y el estado inicial. Cada reacción tiene su propia energía de activación, lo cual es un factor importante para determinar la velocidad de una reacción química. Si reducimos la  $E_a$  de la reacción usando un catalizador, la reacción procede más rápido, indicando que la actividad catalítica de la

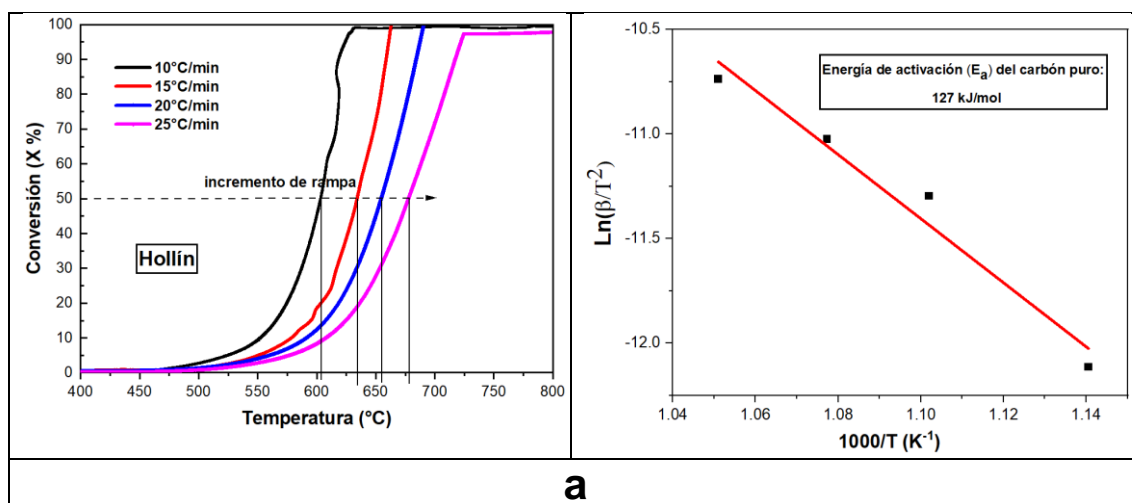
muestra ha mejorado efectivamente hasta cierto punto. Por otra parte, durante el proceso de reacción específica, algunos contaminantes como el CO y el NO serán absorbidos en la superficie del catalizador y luego desorbidos desde la superficie hacia el interior, generando una colisión entre contaminante y moléculas del catalizador. Esta colisión iniciará una reacción química para formar gases inofensivos tales como CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>.<sup>39</sup>

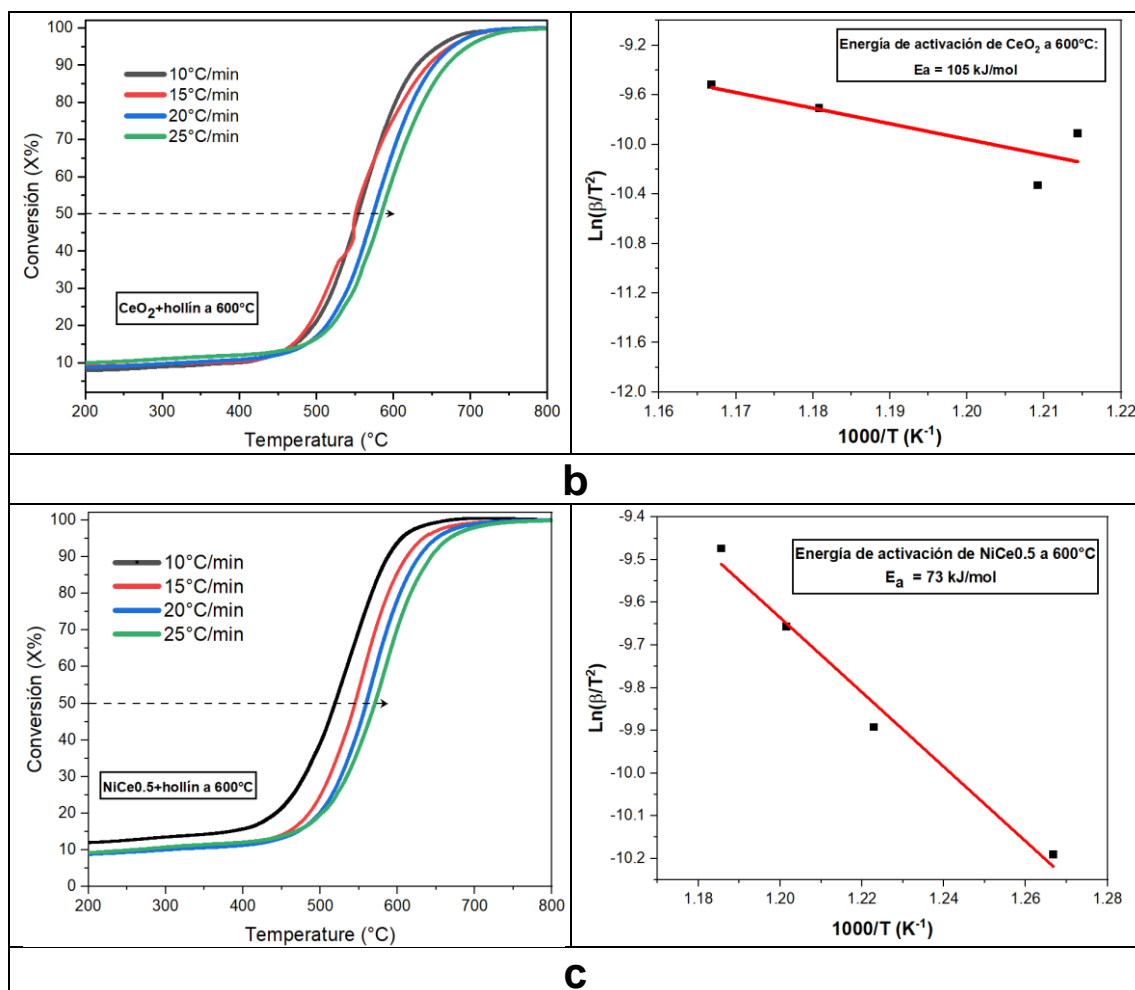
Para este trabajo de investigación, se usó diferentes rampas de calentamiento ( $\beta = 10, 15, 20$  y  $25 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ ) durante la oxidación del hollín en TGA. Se realizaron los gráficos de isoconversión para un nivel de conversión del 50% ( $X = 0.5$ ) en base al método KAS para los catalizadores CeO<sub>2</sub>, Ni<sub>0.5</sub>Ce<sub>9.5</sub> y el hollín calcinado a 600 °C. El NiO presentó un  $T_{50} = 668 \text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 6) por el cual es muy similar a las muestras mixtas calcinadas a 800 °C (Tabla 5). Sin embargo, la adición de pequeñas proporciones de níquel a la red del CeO<sub>2</sub> disminuyó los  $T_{50}$ . Por lo tanto, no es necesario realizar un estudio cinético al NiO. En la Tabla 5 se muestran las  $E_a$  calculadas desde la pendiente del ajuste lineal por mínimos cuadrados de  $\ln(\beta/T^2)$  vs  $1/T_x$  graficadas por el método KAS a un nivel de conversión del 50%.

De la Tabla 5 se observa que la  $E_a$  del hollín no catalizado es  $127 \text{ kJ mol}^{-1}$ , lo cual, tras la presencia de un catalizador en modo de contacto directo (*tight contact*), influenció significativamente esta energía de activación, disminuyendo dramáticamente a 73-105  $\text{kJ mol}^{-1}$ . La buena interacción de las partículas de níquel incorporadas en la red de la ceria obtuvo un efecto altamente positivo en la energía de activación, reduciendo la barrera energética para la combustión del hollín. Esto se observó en el catalizador Ni<sub>0.5</sub>Ce<sub>9.5</sub>(600) que obtuvo la energía de activación más baja ( $73 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Por lo tanto, esto comprueba que el componente Ni es un componente eficiente para activar oxígeno y formar más vacantes de oxígeno, lo cual es beneficioso para acelerar la combustión catalítica del hollín.

**Tabla 5** Energía de activación calculada por el método KAS al 50% de conversión

Catalizador	Energía de activación ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) al 50% de conversión
Hollín(600)	127
CeO <sub>2</sub> (600)	105
Ni <sub>0.5</sub> Ce <sub>9.5</sub> (600)	73





**Figura 6.** Gráficos de isoconversión en  $X = 0.5$  para hollín (600) (a),  $\text{CeO}_2(600)$  (b) y  $\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}(600)$  (c) a diferentes rampas de calentamiento ( $10, 15, 20$  y  $25^\circ\text{C min}^{-1}$ ). Modo de contacto: directo (tight contact).

## CONCLUSIONES

Se prepararon los catalizadores de óxidos mixtos  $\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}$ ,  $\text{Ni}_1\text{Ce}_9$ ,  $\text{Ni}_5\text{Ce}_5$  y  $\text{Ni}_9\text{Ce}_1$  mediante el método de evaporación de solvente a distintas temperaturas ( $600^\circ\text{C}$  y  $800^\circ\text{C}$ ).

Los catalizadores  $\text{Ni}_x\text{Ce}_{10-x}$  preparados a distintas cantidades de Ni mostraron diferentes propiedades fisicoquímicas al ser caracterizados rigurosamente, marcando gran influencia en sus actividades catalíticas en la combustión del hollín con aire. Además, el tamaño de los cristales del catalizador  $\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}(600)$  disminuyeron a  $9\text{ nm}$ , indicio de que el Ni está incorporado dentro de la red de la ceria. El estudio de la espectroscopia Raman confirmó el gran número de vacantes de oxígeno del  $\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}(600)$  y el parámetro de red más alto ( $5.3922\text{ \AA}$ ). Por otra parte, la reducibilidad mejoró ( $205^\circ\text{C}$ ) y su diámetro de poro fue el más alto ( $11\text{ nm}$ ), aumentando el contacto superficial entre el hollín y el catalizador.

Se estudió la actividad catalítica de los catalizadores  $\text{Ni}_x\text{Ce}_{10-x}$  para la combustión del hollín bajo las condiciones de contacto directo (tight contact) usando la técnica TGA. Se encontró que el catalizador  $\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}(600)$  fue el catalizador más activo ( $T_{50} = 519^\circ\text{C}$ )

comparado con los demás catalizadores  $\text{Ni}_x\text{Ce}_{10-x}$ , obteniéndose una disminución de  $157.7^\circ\text{C}$  en la combustión del hollín.

De acuerdo con el método KAS, los valores de  $E_a$  al 50% en conversión durante la combustión del hollín siguieron el siguiente orden: hollín >  $\text{CeO}_2(600)$  >  $\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}(600)$ , siendo el catalizador  $\text{Ni}_{0.5}\text{Ce}_{9.5}(600)$  con la  $E_a$  más baja ( $73\text{ kJ mol}^{-1}$ ), catalizador mixto capaz de activar oxígeno y formar más vacantes de oxígeno, beneficioso para acelerar la combustión catalítica del hollín.

## AGRADECIMIENTO

Este trabajo de investigación fue financiado por CONCYTEC a través del programa FONDECYT Proyecto de investigación Básica - Semilla #384-2019-FONDECYT. Los autores desean expresar su sincero agradecimiento a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arcos, N. “Estudio Cinético de Catalizadores Basados en Óxidos de Níquel (II) y Cerio (IV) para la conversión catalítica de hollín”, 2023 [Tesis de Licenciatura], Lima: Universidad Nacional de Ingeniería; 2023.66p.
2. Medina JC, Rodil SE, & Zanella R. Synthesis of a  $\text{CeO}_2/\text{Co}_3\text{O}_4$  catalyst with a remarkable performance for the soot oxidation reaction. *Catal. Sci. Technol*, 2020; 10<sup>3</sup>, 853–863. <https://doi.org/10.1039/c9cy01821b>
3. Niranjana R, & Thakur AK. The toxicological mechanisms of environmental soot (black carbon) and carbon black: Focus on Oxidative stress and inflammatory pathways. *Front. Immunol*, 2017;. 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00763>
4. Aberkane AB, Yeste MP, Fayçal D, Goma D, & Cauqui MÁ. Catalytic soot oxidation activity of NiO-CeO<sub>2</sub> catalysts prepared by a coprecipitation method: Influence of the preparation pH on the catalytic performance. *Materials*, 2019; 12<sup>20</sup>. <https://doi.org/10.3390/ma12203436>
5. Neelapala SD, & Dasari H. Catalytic soot oxidation activity of Cr-doped ceria ( $\text{Ce}_{1-x}\text{Cr}_x\text{O}_{2-\delta}$ ) synthesized by sol-gel method with organic additives. *Mater. Sci. Energy. Technol*, 2018; 1<sup>2</sup>, 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2018.06.009>
6. Shimizu K, Ichi Kawachi H, & Satsuma A. Study of active sites and mechanism for soot oxidation by silver-loaded ceria catalyst. *Appl. Catal. B: Environ.*, 2010; 96<sup>1-2</sup>, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.02.016>
7. Oi-Uchisawa J, Wang S, Nanba T, Ohi A, & Obuchi A. Improvement of Pt catalyst for soot oxidation using mixed oxide as a support. *Appl. Catal. B: Environ.*, 2003; 44<sup>3</sup>, 207–215. [https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(03\)00055-9](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(03)00055-9)
8. Jin B, Wei Y, Zhao Z, Liu J, Li Y, Li R, Duan A, & Jiang G. Three-dimensionally ordered macroporous  $\text{CeO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ -supported Au nanoparticle catalysts: Effects of  $\text{CeO}_2$  nanolayers on catalytic activity in soot oxidation. *Chinese J. Catal.*, 2017; 38<sup>9</sup>, 1629–1641. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(17\)62798-0](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(17)62798-0)
9. Liu J, Zhao Z, Lan J, Xu C, Duan A, Jiang G, Wang X, & He H. Catalytic combustion of soot over the highly active  $(\text{La}_{0.9}\text{K}_{0.1}\text{CoO}_3)_x/\text{nmCeO}_2$  catalysts. *J. Phys. Chem. C*, 2009; 113<sup>39</sup>, 17114–17123. <https://doi.org/10.1021/jp9056303>

10. Guilhaume N, Bassou B, Bergeret G, Bianchi D, Bosselet F, Desmartin-Chomel A, Jouguet B, & Mirodatos C. In situ investigation of Diesel soot combustion over an  $\text{AgMnO}_x$  catalyst. *Appl. Catal. B: Environ.*, 2012;119–120, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2012.03.009>
11. Rangaswamy A, Sudarsanam P, & Reddy BM. Rare earth metal doped  $\text{CeO}_2$ -based catalytic materials for diesel soot oxidation at lower temperatures. *J. Rare Earths*, 2015; 33<sup>11</sup>, 1162–1169. <https://doi.org/10.1016/S1002-0721<sup>14</sup>60541-X>
12. Bueno-López A, Krishna K, van der Linden B, Mul G, Moulijn JA, & Makkee M. On the mechanism of model diesel soot- $\text{O}_2$  reaction catalysed by Pt-containing  $\text{La}^{3+}$ -doped  $\text{CeO}_2$ . A TAP study with isotopic  $\text{O}_2$ . *Catal. Today*, 2007; 121<sup>3-4</sup>, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2006.06.048>
13. Zhao M, Chen S, Zhang X, Gong M, & Chen Y. Performance of Pd/ $\text{CeO}_2$ - $\text{ZrO}_2$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  catalyst for motorcycle. *J. Rare Earths*, 2009; 27<sup>5</sup>, 728–732. <https://doi.org/10.1016/S1002-0721<sup>08</sup>60324-5>
14. Fino D, Bensaid S, Piumetti M, & Russo N. A review on the catalytic combustion of soot in Diesel particulate filters for automotive applications: From powder catalysts to structured reactors. *Appl. Catal. A: Gen.*, 2016; 509, 75–96. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2015.10.016>
15. Harada K, Oishi T, Hamamoto S, & Ishihara T. Lattice oxygen activity in Pr- and La-Doped  $\text{CeO}_2$  for low-temperature soot oxidation. *J. Phys. Chem. C*, 2014; 118<sup>1</sup>, 559–568. <https://doi.org/10.1021/jp410996k>
16. Huang H, Liu J, Sun P, Ye S, & Liu B. Effects of Mn-doped ceria oxygen-storage material on oxidation activity of diesel soot. *RSC Adv.*, 2017; 7<sup>12</sup>, 7406–7412. <https://doi.org/10.1039/c6ra27007g>
17. Laguna OH, Centeno MA, Boutonnet M, & Odriozola JA. Fe-doped ceria solids synthesized by the microemulsion method for CO oxidation reactions. *Appl. Catal. B: Environ.*, 2011; 106<sup>3-4</sup>, 621–629. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2011.06.025>
18. Castoldi L, Matarrese R, Lietti L, & Forzatti P. Intrinsic reactivity of alkaline and alkaline-earth metal oxide catalysts for oxidation of soot. *Appl. Catal. B: Environ.*, 2009; 90<sup>1-2</sup>, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2009.03.022>
19. Lim CB, Kusaba H, Einaga H, & Teraoka Y. Catalytic performance of supported precious metal catalysts for the combustion of diesel particulate matter. *Catal. Today*, 2011; 175<sup>1</sup>, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2011.03.062>
20. Aouad S, Abi-Aad E, & Aboukaïs A. Simultaneous oxidation of carbon black and volatile organic compounds over Ru/ $\text{CeO}_2$  catalysts. *Appl. Catal. B: Environ.*, 2009; 88<sup>3-4</sup>, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2008.10.002>
21. Liu S, Wu X, Weng D, & Ran R. Ceria-based catalysts for soot oxidation: A review. *J. Rare Earths*, 2015; 33(6), 567–590. <https://doi.org/10.1016/S1002-0721<sup>14</sup>60457-9>
22. Aneggi E, de Leitenburg C, Dolcetti G, & Trovarelli A. Diesel soot combustion activity of ceria promoted with alkali metals. *Catal. Today*, 2008; 136<sup>1-2</sup>, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2008.01.002>
23. Xiong J, Mei X, Liu J, Wei Y, Zhao Z, Xie Z, & Li J. Efficiently multifunctional catalysts of 3D ordered meso-macroporous  $\text{Ce}_{0.3}\text{Zr}_{0.7}\text{O}_2$ -supported PdAu@ $\text{CeO}_2$  core-shell nanoparticles for soot oxidation: Synergetic effect of Pd-Au- $\text{CeO}_2$  ternary components. *Appl. Catal. B: Environ.*, 2019; 251(December 2018), 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.03.078>

24. Rana S, Parikh JK, & Mohanty P. Thermal degradation and kinetic study for different waste/rejected plastic materials. *Korean J. Chem. Eng*, 2013; 30<sup>3</sup>, 626–633. <https://doi.org/10.1007/s11814-012-0157-2>
25. Aberkane AB, Yeste MP, Fayçal D, Goma D, & Cauqui MÁ. Catalytic soot oxidation activity of NiO-CeO<sub>2</sub> catalysts prepared by a coprecipitation method: Influence of the preparation pH on the catalytic performance. *Materials*, 2019; 12<sup>20</sup>. <https://doi.org/10.3390/ma12203436>
26. Ambroz F, Macdonald TJ, Martis V, & Parkin IP. Evaluation of the BET theory for the characterization of meso and microporous MOFs. *Small Methods*, 2018; Vol. 2, Issue 11. <https://doi.org/10.1002/smt.201800173>
27. Su C, Wang Y, Kumar A, & McGinn PJ. Simulating real world soot-catalyst contact conditions for lab-scale catalytic soot oxidation studies. *Catalysts*, 2018; 8<sup>6</sup>. <https://doi.org/10.3390/catal8060247>
28. Bueno-López A, Krishna K, Makkee M, & Moulijn JA. Enhanced soot oxidation by lattice oxygen via La<sup>3+</sup>-doped CeO<sub>2</sub>. *J. Catal*, 2005; 230<sup>1</sup>, 237–248. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2004.11.027>
29. Stanmore BR, Brilhac JF, & Gilot P. The oxidation of soot: A review of experiments, mechanisms and models. *Carbon*, 2001; 39<sup>15</sup>, 2247–2268. <https://doi.org/10.1016/S0008-6223<sup>01</sup>00109-9>
30. Kurian M. Cerium oxide based materials for water treatment-A review. *J. Environ. Chem. Eng*, 2020;<sup>85</sup>. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104439>
31. Ayastuy JL, Iglesias-González A, & Gutiérrez-Ortiz MA. Synthesis and characterization of low amount tin-doped ceria (Ce<sub>x</sub>Sn<sub>1-x</sub>O<sub>2-δ</sub>) for catalytic CO oxidation. *Chem. Eng. J*, 2014; 244, 372–381. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.01.077>
32. Mishra A, & Prasad R. (2017). Catalysis and kinetics of diesel soot oxidation over nano-size perovskite catalyst. *Clean Technol. Environ. Policy*, 2017; 19<sup>10</sup>, 2405–2416. <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1428-8>
33. Guillén-Hurtado N, Giménez-Mañogil J, Martínez-Munuera JC, Bueno-López A, & García-García A. Study of Ce/Pr ratio in ceria-praseodymia catalysts for soot combustion under different atmospheres. *Appl. Catal. A: Gen*, 2020; 590. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2019.117339>
34. Bensaid S, Piumetti M, Novara C, Giorgis F, Chiodoni A, Russo N, & Fino D. Catalytic Oxidation of CO and Soot over Ce-Zr-Pr Mixed Oxides Synthesized in a Multi-Inlet Vortex Reactor: Effect of Structural Defects on the Catalytic Activity. *Nanoscale Res. Lett*, 2016; 11<sup>1</sup>. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1713-1>
35. Yao X, Tang C, Ji Z, Dai Y, Cao Y, Gao F, Dong L, & Chen Y. Investigation of the physicochemical properties and catalytic activities of Ce<sub>0.67</sub>M<sub>0.33</sub>O<sub>2</sub> (M = Zr<sup>4+</sup>, Ti<sup>4+</sup>, Sn<sup>4+</sup>) solid solutions for NO removal by CO. *Catal. Sci. Technol*, 2013; 3<sup>3</sup>, 688–698. <https://doi.org/10.1039/c2cy20610b>
36. Anushree KS, & Sharma C. NiO–CeO<sub>2</sub> nano-catalysts: Synthesis, characterization and application in catalytic wet air oxidation of wastewater. *Mater. Res. Express*, 2015; 5<sup>5</sup>, 419–428. <https://doi.org/10.1166/mex.2015.1251>
37. Van Setten BAAL, Makkee M, & Moulijn JA. Science and technology of catalytic diesel particulate filters. *Catal Rev Sci Eng*, 2001; 43<sup>4</sup>, 489–564. <https://doi.org/10.1081/CR-120001810>



38. Wen Z, Duan X, Hu M, Cao Y, Ye L, Jiang L, & Yuan Y. Efficient low-temperature soot combustion by bimetallic Ag–Cu/SBA-15 catalysts. *J. Environ. Sci. (China)*, 2018; 64, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.12.021>
39. Liu Y, Fu P, Bie K, Xu T, & Ahsan M. Non-isothermal kinetics of coal char oxyfuel combustion by isothermal model-fitting method. *Energy Rep*, 2022; 8, 2062–2071. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2022.01.125>

# COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA Y ANTI-CANDIDA ALBICANS *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *CINCHONA PUBESCENS* VAHL

Américo Castro Luna<sup>\*a</sup>, Norma Ramos Cevallos<sup>b</sup>, Jose Ponce Cobos<sup>c</sup>, Donal Ramos Perfecto<sup>d</sup>, Lourdes Victoria Tinoco<sup>b</sup>, Felix Castillo Morales<sup>b</sup>

## RESUMEN

Se analizó la composición química, la actividad antioxidante, antibacteriana y anti-Candida albicans *in vitro* del aceite esencial de las hojas de *Cinchona pubescens* Vahl. originario de la región de Lambayeque. Los compuestos fitoquímicos predominantes detectados por análisis de HPLC fueron el fitol (36,98 %), n-Tetratetracontano (9,38 %) y heneicosano (6,69 %). Se emplearon los métodos de DPPH, ABTS y FRAP para determinar la actividad antioxidante y el método por difusión en agar para evaluar la actividad antibacteriana y anti-Candida albicans *in vitro*. Se encontró que el aceite esencial de las hojas de *Cinchona pubescens* posee un IC50 de 273.029 mg/mL y TEAC de 0.0089mg Trolox/g muestra con el método DPPH; con ABTS un IC50 de 1.2801 mg/mL y un TEAC de 3.5584 mg Trolox/g muestra y con FRAP se obtuvo un AAEAC de 1.622 mg AA/ g aceite. Además, el ensayo de actividad antimicrobiana y anti-Candida albicans expresó resultados negativos frente a *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. En conclusión, el análisis de HPLC de la composición química del aceite esencial no presentó ningún compuesto con capacidad antioxidante y a pesar de contener n-tetratetracontano y heneicosano, compuestos con capacidad antimicrobiana, no se observó ninguna inhibición del crecimiento bacteriano.

**Palabras clave:** Antioxidante, *Candida albicans*, *Cinchona Pubescens*, antibacteriano.

## CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL AND ANTI-CANDIDA ALBICANS ACTIVITY IN VITRO OF THE ESSENTIAL OIL OF *CINCHONA PUBESCENS* VAHL. LEAVES

### ABSTRACT

The chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-Candida albicans activity *in vitro* of the essential oil of *Cinchona pubescens* Vahl. leaves from the Lambayeque region were analyzed. The predominant phytochemical compounds detected by HPLC

<sup>a</sup> Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Miguel Grau 755, Lima 23, Perú, [acastrol@unmsm.edu.pe](mailto:acastrol@unmsm.edu.pe)

<sup>b</sup> Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Av. Miguel Grau 755, Lima 23, Perú.

<sup>c</sup> Departamento de Química Básica y Aplicada, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Av. Miguel Grau 755, Lima 23, Perú.

<sup>d</sup> Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Av. Germán Sede Central Jorge Basadre, Lima 15081, Perú.

analysis were phytol (36,98 %), n-Tetratetracontan (9,38 %) and heneicosane (6,69 %). The DPPH, ABTS and FRAP methods were used to determine the antioxidant activity and the agar diffusion method was used to evaluate the antibacterial and anti-*Candida albicans* activity in vitro. The essential oil of *Cinchona pubescens* leaves was reported to have an IC<sub>50</sub> of 273.029 mg/mL and TEAC of 0.0089mg Trolox/g sample with the DPPH method; with ABTS an IC<sub>50</sub> of 1.2801 mg/mL and a TEAC of 3.5584 mg Trolox/g sample and with FRAP an AAEAC of 1.622 mg AA/ g oil was obtained. In addition, the antimicrobial and anti-*Candida albicans* activity assay expressed negative results against *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. In conclusion, the HPLC analysis of the chemical composition of the essential oil did not present any compounds with antioxidant capacity and despite containing n-tetratetracontan and heneicosane, compounds with antimicrobial capacity, no inhibition of bacterial growth was observed.

**Key words:** Antioxidant, *Candida albicans*, *Cinchona Pubescens*, antibacterial.

## INTRODUCCIÓN

La cinchona pertenece a la familia Rubiaceae y es originaria de la cordillera de los Andes en Sudamérica; aunque, también se puede encontrar en Indonesia, Camerún, Vietnam, la India y en otros países asiáticos y africanos (1). En el Perú, se ha reportado que el género *Cinchona* presenta quinina, un alcaloide con propiedades antifebrífugas, considerando a *Cinchona officinalis* como la especie más importante desde un punto de vista medicinal, ya que su corteza produce en promedio el 40% de alcaloides cristalizables y el 1% de sulfato de quinina (2). Los polifenoles son considerados potentes antioxidantes que pueden prevenir enfermedades asociadas al estrés oxidativo como el cáncer (4,5). La actividad antioxidante de los extractos vegetales es estimable mediante diversos métodos (4); además, se ha encontrado evidencia de que *Cinchona pubescens* puede ser una fuente natural de antioxidantes por los flavonoides (3). Añadido a esto, en Jordania, estudios han confirmado que la especie *Cinchona ledgeriana* presenta un uso tradicional como antidiabético debido a su alta actividad antioxidante. Así mismo, en la India, estudios reportaron que los extractos de la *Cinchona officinalis* poseen alta defensa frente al estrés oxidativo debido a la capacidad antioxidante otorgada por los compuestos fenólicos encontrados en dichos extractos.

En las últimas décadas, las infecciones fúngicas aumentan increíblemente con el género *Candida* como la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados e inmunocomprometidos (8). En Colombia, Niño *et al.* (2017) evaluaron la actividad antifúngica de 22 plantas de la flora colombiana mediante el método de difusión en agar frente a *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Fusarium solani* utilizando ketoconazol como control positivo. Siendo una de ellas el extracto con diclorometano de *Cinchona pubescens* Vahl, el cual mostró actividad moderada solo frente a *Candida albicans* (9). En India, Shinde *et al.* (2018), evaluaron la actividad *in vitro* de diferentes medicinas homeopáticas para inhibir *Candida albicans* siendo el estándar de *Cinchona officinalis* a diferentes potencias (6C, 12C, 30C, 200C, 1M), siendo la potencia 12C la que mostró mayor zona de inhibición ( $0,9 \pm 0,42$  cm) (10). La resistencia bacteriana a los medicamentos es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, ya que algunas infecciones bacterianas no responden a los tratamientos actuales y están aumentando, por lo que existe la necesidad de desarrollar nuevos antibióticos (11). Peñarreta *et al.* (2023) realizaron un estudio sobre la valoración de distintas especies

vegetales con uso tradicional en medicina que son originarias de América del Sur, la especie que más resalto fue la *Cinchona pubescens*, la cual es un componente importante de la medicina tradicional en diferentes países de América Central y del Sur, se utiliza mayormente como fuente de quinina desde su descubrimiento como medicamento eficaz contra la malaria en el siglo XVII. Sin embargo, también se menciona que se sigue investigando algunas otras actividades biológicas que puedan contener (12). En un estudio realizado en el 2020, Antika *et al.* examinaron la actividad antimicrobiana de los derivados de la quinina, el cual fue extraído de la corteza de *Cinchona spp.* y su Concentración Mínima Inhibitoria contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* mediante la prueba de difusión en disco. Los resultados fueron comparados con la estreptomycin. Se obtuvo que el propionato de quinina proporcionaba mayor actividad antimicrobiana, con un rango de inhibición de 9 a 23,5 mm en comparación de la estreptomycin con un rango de inhibición de 8 a 12 mm (13). Es de esta manera que las investigaciones antes mencionadas nos llevan a evaluar la composición química, actividad antioxidante, anti-Candida y antibacteriana in vitro del aceite esencial de las hojas de *Cinchona pubescens* Vahl.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Colecta y tratamiento de las muestras

Las hojas de *Cinchona pubescens* Vahl. fueron colectadas del bosque de neblina de Upaypíteq, distrito de Cañaris, provincia de Ferreñafe, región de Lambayeque a 2800 msnm. Esto se realizó durante el mes de abril del año 2023. Las muestras fueron secadas a la exposición solar indirecta y al aire libre.

### Obtención del aceite esencial

Se utilizó la técnica de arrastre por vapor de agua en un destilador semiindustrial de acero inoxidable con capacidad de 6Kg de materia vegetal seca. Se trabajó con 47.4 kg de hojas secas de *Cinchona pubescens* Vahl.

### Determinación de la composición química

La determinación de la composición química del aceite esencial de las hojas de *Cinchona pubescens* Vahl. se realizó mediante el método de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). La temperatura de la columna cromatográfica fue de 25 °C. La fase móvil se formó por una mezcla de agua con ácido trifluoroacético al 0,1% y acetonitrilo. Por otro lado, su caudal fue de 0,2 mL/min. Asimismo, el volumen de inyección tuvo el valor de 5 uL (14). La identificación y asignación de picos de los componentes químicos del aceite esencial de las hojas de *Cinchona pubescens* Vahl. se basaron en la comparación de los tiempos de retención y los datos espectrales con los de los estándares siendo controlados a una longitud de onda de 262 nm (15).

### Determinación de la actividad antioxidante in vitro por el método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH•)

La solución stock se obtuvo disolviendo 2,4 mg de DPPH en 100 mL de metanol y posteriormente se dejó reposando a una temperatura de -20°C hasta su uso. La solución

de trabajo se consiguió reaccionando 10 mL de la solución stock con 45 mL de metanol hasta la obtención de una absorbancia de 1.10 (+/- 0.02) a una longitud de onda de 517 nm. Para la lectura, se tomó 20 µL de muestras que reaccionaron con 9900 µl de la solución de trabajo DPPH durante 24 horas en la oscuridad. Luego se midió la absorbancia a 517 nm. El antioxidante de referencia fue Trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%) y se utilizaron cinco concentraciones de Trolox (100, 250, 500, 750 y 1000 µM) a partir de un stock de Trolox 2.0 mM para 10 mL con el fin de la preparación de la curva de Trolox. Los resultados se expresaron en actividad antioxidante equivalente a µg EqTrolox/g muestra (TEAC). El valor de TEAC se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{TEAC} = \text{IC 50 (Trolox } \mu\text{g/mL)} / \text{IC 50 (DPPH}\cdot\text{ extracto) mg/mL}$$

El IC50 correspondió a la concentración en la que se neutraliza el 50% de los radicales libres de DPPH (17). El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Inhibición} = (\text{Abs.Control} - \text{Abs.Muestra}) / (\text{Abs.Control}) \times 100$$

#### **Determinación de la actividad antioxidante in vitro por el método de captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbezotiazolin)- 6-sulfónico (ABTS•+)**

La actividad antioxidante se determinó utilizando el catión radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•+) según Re *et al.* (16). El ABTS se disolvió en agua a una concentración de 7 mmol/L para la obtención de la solución madre. El catión ABTS•+ se obtuvo reaccionando la solución madre de ABTS con 2,45 mmol/L de persulfato de potasio y se mantuvo en reposo sin luz a temperatura ambiente durante 16 horas antes de su uso. Luego la solución ABTS•+ se diluyó con agua destilada hasta la obtención de una absorbancia de 0.70 (+/- 0.02) a una longitud de onda de 734 nm. Las muestras se diluyeron con etanol hasta que se produzca una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco. Para la lectura, se tomó 980 uL de la solución ABTS•+ y 20 uL de muestra y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro por 7 minutos consecutivos por triplicado a una longitud de onda de 734 nm. El antioxidante de referencia fue Trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%) y se utilizaron cinco concentraciones de Trolox (100, 250, 500, 750 y 1000 µM) a partir de un stock de Trolox 2.0 mM para 10 mL con el fin de la preparación de la curva de Trolox. Los resultados se expresaron en actividad antioxidante equivalente a µg EqTrolox/g muestra (TEAC). El TEAC se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{TEAC} = \text{IC 50 (Trolox } \mu\text{g/mL)} / \text{IC 50 (ABTS}\cdot\text{+ extracto) mg/mL}$$

El IC50 correspondió a la concentración en la que se neutraliza el 50% de los radicales libres de ABTS•+. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Inhibición} = (\text{Abs.Control} - \text{Abs.Muestra}) / (\text{Abs.Control}) \times 100$$

#### **Determinación de la actividad antioxidante in vitro por el método del poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)**

El reactivo FRAP se preparó con amortiguador de acetato al 0.3M, pH 3,6; con una solución de Tris a 10 mM (2-pyridyl)-s-triazina (TPTZ) en HCl al 40 mM; y FeCl<sub>3</sub> al 20 mM, en una proporción 10:1:1. Seguidamente, se preparó la solución madre de 2 mg/mL de extracto, en base a ello se realizaron diluciones a partir de 12,5 µg/mL hasta 100 µg/mL. En este caso, se utilizó ácido ascórbico como estándar por lo que la curva de calibración se elaboró en base a las diluciones que van de 5 µmol/L a 25 µmol/L. Por último, se colocó en un tubo de ensayo 50µL de la muestra problema y 950µL de la

solución de trabajo de FRAP, luego se agitó y se dejó en reposo en un ambiente oscuro por 15 minutos, luego se procedió a realizar la lectura de absorbancias a 593 nm (18). El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = (\text{Abs. FRAP} - \text{Abs.muestra}) / (\text{Abs.FRAP}) \times 100$$

Además, se midió el IC<sub>50</sub> (concentración mínima necesaria para inhibir al 50% del FRAP) y el AAEAC (capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico), el cual se midió en mg de ácido ascórbico/g de extracto.

El valor de AAEAC se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{AAEAC} = \text{IC}_{50} \text{ Ácido ascórbico } \mu\text{g/mL} / \text{IC}_{50} \text{ FRAP muestra mg/mL}$$

### Determinación de la actividad antimicrobiana y anti-candida del aceite esencial de *Cinchona pubescens* Vahl.

Se evaluó la actividad anti-*Candida albicans* y antimicrobiana de la *Cinchona pubescens* Vahl (Quina), que determina si el aceite esencial de esta planta genera un efecto antimicrobiano sobre los siguientes microorganismos como: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 10231.

Para determinar la actividad antimicrobiana se desarrolló la prueba de difusión en agar con discos (Técnica de Oliveira EC *et al*) (19). Para ello lo primero que se realizó fue activar las cepas mencionadas en diferentes medios de cultivos; *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* se activó en medios de tripticosa soya agar (TSA) y *Candida albicans* en agar Sabouraud. Una vez activadas, se colocaron de 3 a 5 colonias de cada microorganismo en una solución de 5 mL de suero fisiológico, para la obtención de una dilución con un nivel de turbidez equivalente a 0,5 del estándar de McFarland (1-2 X 10<sup>8</sup> UFC/ mL). De cada dilución se obtuvo una alícuota de 100 µL el cual es sembrado por diseminación en un medio de agar Mueller Hinton, una vez hecho la siembra en los medios, se colocaron los discos de papel cargado con 10 µl del aceite esencial de *Cinchona pubescens* Vahl al 100% a nivel central de cada placa de agar. La incubación de los medios se realizó a 37°C por 48 horas, previamente los medios de agar fueron colocados dentro de un cilindro metálico donde se colocó una vela encendida (método de la vela extinguida), pasado el periodo de incubación se retiraron las placas para su lectura correspondiente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención del aceite esencial

Se realizaron en total 8 extracciones por el destilador de arrastre por vapor de agua, con un total de 47.4 kg de hojas secas de *Cinchona pubescens* Vahl. y la obtención de 4.8 ml de aceite esencial. Las características generales del aceite se pueden apreciar en la tabla 1.

**Tabla 1.** Características del aceite esencial de hojas de *Cinchona pubescens* Vahl.

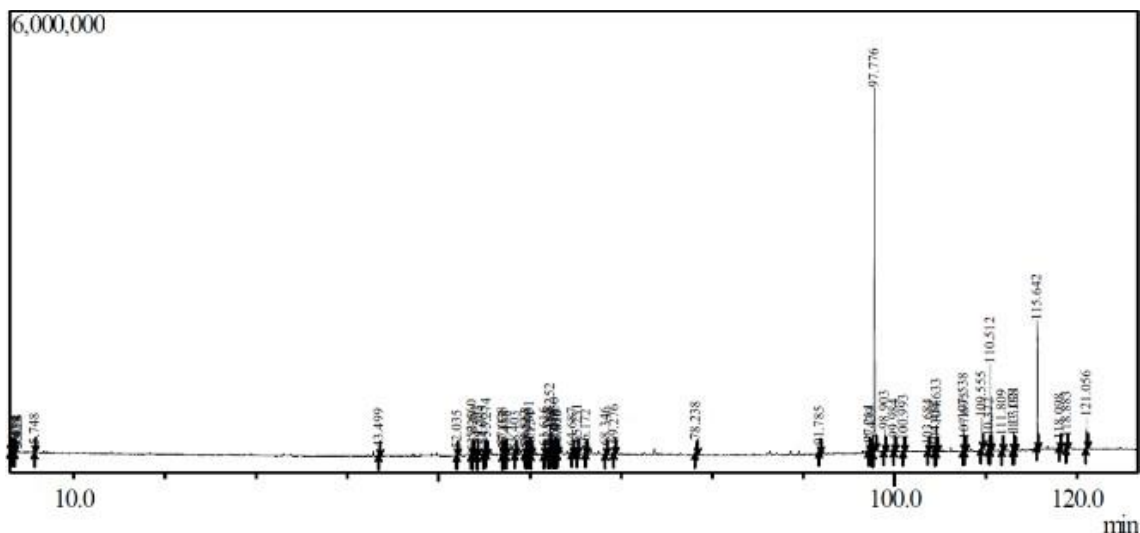
Constantes	Valores
Rendimiento en seco	0.01 % v/p
Densidad	0.8401 g/ml
pH	2.3



**Figura 1.** Hojas secas de *Cinchona pubescens* Vahl.

#### Determinación de la composición química

Tras realizar el análisis cromatográfico por HPLC se encontraron como componentes de mayor área relativa del cromatograma: fitol (36.98 %), n-Tetratetracontano (9.38 %) y heneicosano (6.69 %).



**Figura 2.** Cromatograma de la muestra de aceite esencial de *Cinchona pubescens* Vahl.

Otros compuestos se encontraron en bajas concentraciones, como son el escualeno, el cloruro de palmitoilo, el 2-metil tetracosano, 1-heptacosanol.

La composición química del aceite esencial de *Cinchona pubescens* Vahl. por análisis de HPLC presentó la presencia en mayor porcentaje del fitol (36.98 %), un precursor de

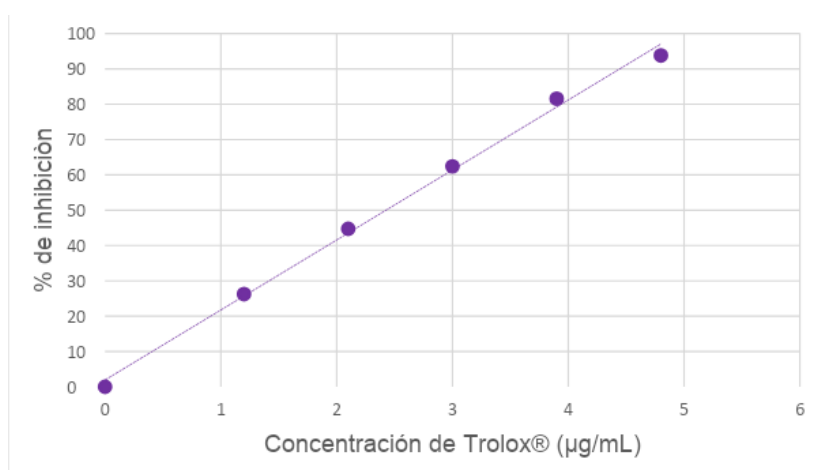
tocoferoles y filoquinonas, n-Tetratetracontano (9.38 %) y heneicosano (6.69 %), ambos con actividad antimicrobiana documentada en otras especies vegetales como *Allium chinense* G. y *Plumbago zeylanica* L. (20, 21). La presencia de estos compuestos explica la baja actividad antioxidante en las pruebas *in vitro*, puesto que el componente de mayor concentración actúa exclusivamente como precursor de sustancias antioxidantes, como los tocoferoles.

### Determinación de la actividad antioxidante por el método de 2, 2- difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Se preparó una solución stock de DPPH al 40 % en metanol, de esta solución se tomó 3 mL y se diluyó con 42 mL de metanol presentando una absorbancia de 0,682.

**Tabla 2.** Captación de radical libre DPPH de Trolox.

Concentración del Trolox (µg/mL)	Absorbancia	Inhibición (%) DPPH	IC 50 (µg/mL)
0	0.4581	0.0000	2.4264
1,2	0.3379	26.2334	
2,1	0.2532	44.7242	
3	0.1721	62.4218	
3,9	0.0845	81.5602	
4,8	0.0284	93.8000	

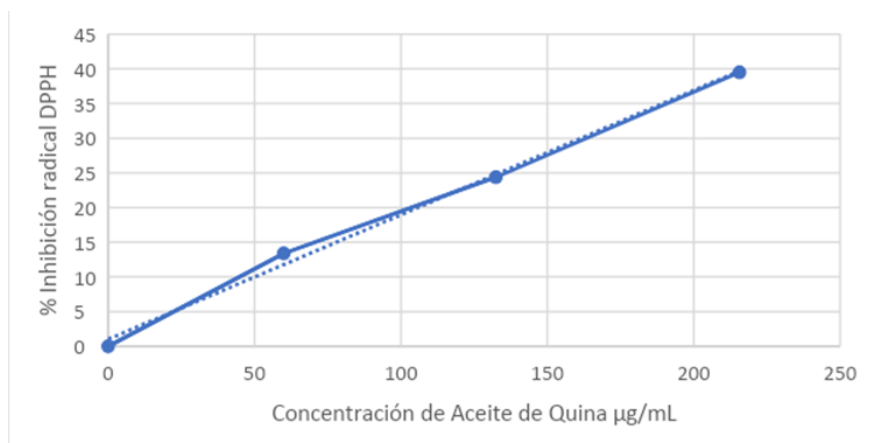


**Figura 3.** %Inhibición DPPH vs Estándar Trolox®.

**Tabla 3.** Captación de radical libre DPPH del ACEITE ESENCIAL.

Concentración del aceite (mg/mL)	Absorbancia	Inhibición (%) DPPH	IC 50 (mg/mL)
0	0.5223	0	273.029
59.96	0.4523	13.4014	
132.4	0.3950	24.3778	
215.62	0.3160	39.5022	





**Figura 4.** Grafica de dispersión % Actividad Antioxidante vs Concentración.

**TEAC = 0.0089mg Trolox/g muestra**

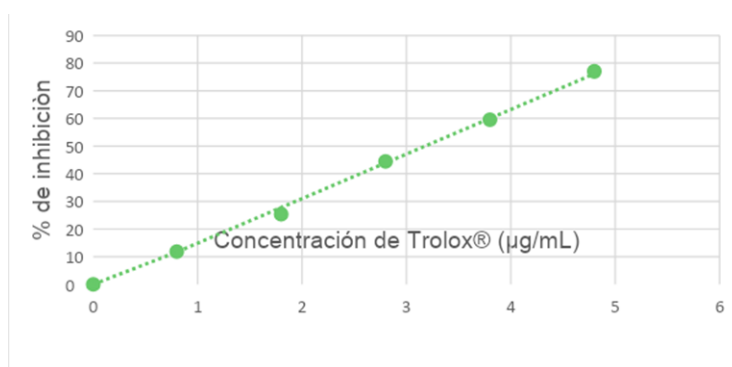
Para el método de actividad antioxidante mediante la captación del radical libre 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), el aceite esencial de hojas de *Cinchona pubescens* Vahl. presenta un TEAC de 0.0089mg Trolox/g muestra, lo que se expresa como una actividad antioxidante muy baja.

#### **Determinación de la actividad antioxidante por el método de $\beta$ , $\beta'$ - azinobis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS•+)**

Se preparó una solución stock de ABTS al 2,45 mM en metanol, de esta solución se tomó 600  $\mu$ L, y se diluyó con 36 mL de metanol presentando una absorbancia de 0,718.

**Tabla 4.** Captación de radical libre ABTS de Trolox.

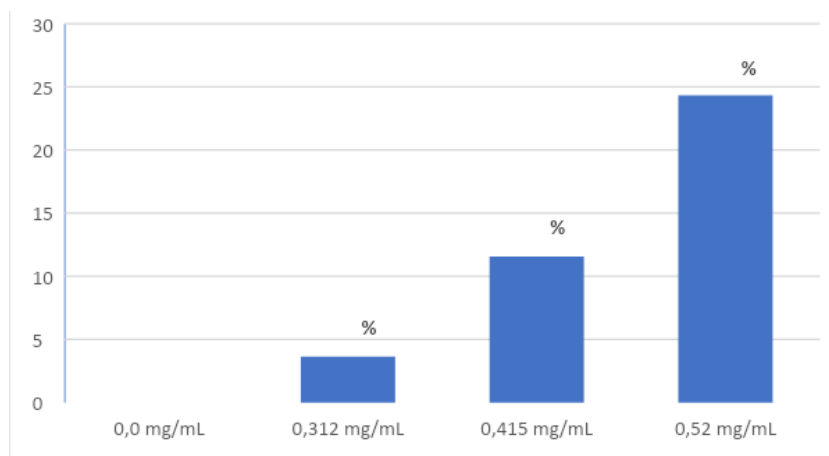
Concentración del Trolox ( $\mu$ g/mL)	Absorbancia	Inhibición (%) ABTS•+	IC 50 ( $\mu$ g/mL)
0	0.6757	0.683	3.1793
0.8	0.5853	0.614	
1.8	0.5091	0.5061	
2.8	0.3808	0.3802	
3.8	0.2834	0.2673	
4.8	0.1637	0.1647	



**Figura 5.** %Inhibición ABTS•+ vs Estándar Trolox®.

**Tabla 5.** Captación de radical libre ABTS del aceite esencial.

Concentración del aceite (mg/mL)	Absorbancia	Inhibición (%) ABTS•+	IC 50 (mg/mL)
0	0.6423	0	1.2801
0.312	0.6190	3.6326	
0.415	0.5680	11.5724	
0.52	0.4860	24.3383	

**Figura 6.** %Inhibición del radical ABTS•+.

**TEAC = 3.5584mg Trolox/g muestra**

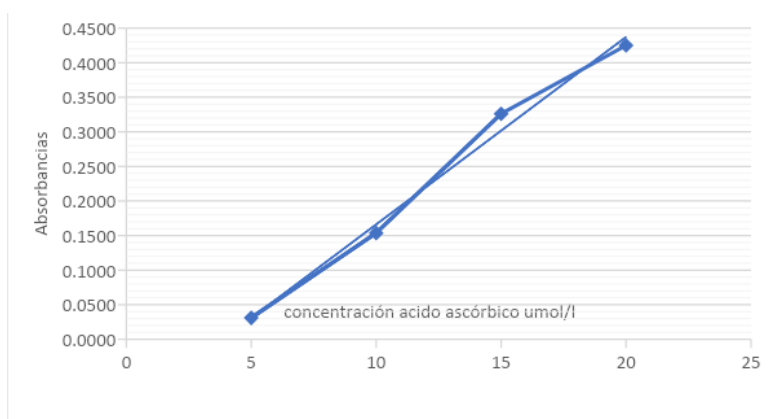
Para el método de actividad antioxidante por el método de captación del radical catiónico de  $\beta$ ,  $\beta'$ - azinobis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS•+), el aceite esencial de hojas de *Cinchona pubescens* Vahl. presenta un TEAC de 3.5584mg Trolox/g muestra, lo que se expresa como una actividad antioxidante muy baja. Sin embargo, se resalta que este valor es mayor en comparación con el TEAC por el método de DPPH•+.

#### **Determinación de la actividad antioxidante in vitro por el método FRAP**

Se colocó en un tubo de ensayo 50 $\mu$ L de la muestra problema y 950 $\mu$ L de la solución de trabajo de FRAP, luego se procedió a realizar la lectura de absorbancias a 593 nm (18). Además, se midió el IC50 (concentración mínima necesaria para inhibir al 50% del FRAP) y el AAEAC (capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico) en mg de ácido ascórbico/g de extracto.

**Tabla 6.** Poder reductor Férrico del estándar ácido ascórbico.

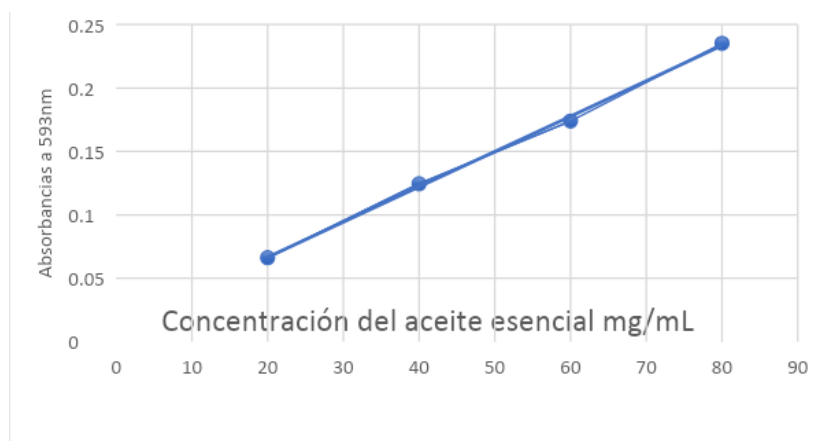
Concentración (umol/L)	Absorbancia (A)
5	0.0307
10	0.1537
15	0.3200
20	0.4250
25	0.5453



**Figura 7.** Poder reductor férrico de Acido Ascórbico.

**Tabla 7.** Poder reductor férrico del aceite esencial.

Concentración (mg/ml)	Absorbancia (Abs)
8.994	0.048
19.86	0.391



**Figura 8.** Poder reductor férrico del aceite esencial.

Para el método de actividad antioxidante mediante el poder antioxidante reductor del hierro (FRAP), el aceite esencial de hojas de *Cinchona pubescens* Vahl. presenta un TEAC de 1.622 mg AA/g muestra, lo que se expresa como una actividad antioxidante muy baja.

La actividad antioxidante según el método DPPH determinó que su IC50 fue de 273.029 mg/mL, un dato muy alejado en comparación a su estándar (Trolox) el cual su IC50 fue de 2.4264 ug/mL. Un resultado similar fue alcanzado a través del método ABTS, donde el IC50 fue de 1.2801 mg/mL, mientras que para el estándar se encontró un IC50 de 3.1793 ug/mL. En el ensayo de FRAP se determinó un poder reductor de hierro equivalente a 1.622 mg AA/ g aceite. Estos tres resultados demuestran la baja actividad antioxidante encontrada en el aceite esencial extraído de las hojas de esta especie de Cinchona, explicada por la ausencia de fitoquímicos con este tipo de propiedades.

### Determinación de la actividad antimicrobiana y anti-*Candida albicans* del aceite esencial de las hojas de *Cinchona pubescens* Vahl.

Los resultados de la lectura indicaron la ausencia de halos de inhibición para las diferentes placas donde se enfrentaron los diferentes microorganismos con la *Cinchona pubescens* Vahl., el cual indicaría un nivel de sensibilidad nula de los microorganismos hacia el aceite esencial de quina (Figura 1) según la escala de Duraffourd (3).



**Figura 9.** Antibiograma de las cepas *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* frente al aceite esencial de *Cinchona pubescens* Vahl.

En relación a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cinchona pubescens* Vahl., esta no presentó actividad sobre los tres microorganismos enfrentados; *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Estudios como el de Rojas *et al.* Determinaron que el extracto alcohólico de *Cinchona officinalis* tuvo efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus  $\beta$  hemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. No presentando efecto sobre *Escherichia coli*. Si bien es cierto que el efecto sobre *Candida* es contradictorio con los resultados del estudio, se tiene que indicar que el producto que utilizamos en la prueba es distinto, en la investigación se usó un aceite esencial. Así también en el mismo estudio de Rojas *et al.* al probar el extracto acuoso de la *Cinchona officinalis*, esta no genera ningún efecto antimicrobiano sobre los diferentes microorganismos mencionados en su estudio, esto indicaría que el uso del alcohol para la maceración de la planta podría ser un factor que generaría una mayor liberación de los principios activos antimicrobianos de la planta, que en este caso podrían ser los alcaloides u otros (22). Además, estudios como el de Antika *et al.*, indican que un derivado de la quina, el éster propionato de quinina a la concentración del 5% del extracto tiene un efecto sobre *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Bacillus subtilis*, no presentando efecto sobre *S. aureus* (23). Ramić *et al.*, determinó que derivados de la Cinchona; cinchonina y la cinchonidina presentaron actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positiva y Gram negativas (24). En el mismo sentido Reza *et al.*, menciona en su revisión que derivados de Cinchona (Quinina y otros) tienen efectos antibacterianos, antiviral y antifúngicos, resaltando su efecto antibacteriano sobre *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, indicando que derivados de la quinina inhibirían la síntesis del ADN por derivados de la quinolina que generaría la muerte bacteriana a medida que se fragmenta el ADN girasa. Así también en relación con su actividad antifúngica contra *C. albicans* esta se daría por una quinolina que generaría cambios en la permeabilidad de su membrana y pérdida del potencial de la membrana mitocondrial (25). Los autores antes mencionados enfatizan alguna actividad antimicrobiana de la Cinchona, pero evaluando productos derivados de la planta, en el

estudio realizado se utilizó un aceite esencial de Cinchona, un producto total, diferente a un extracto u otros derivados, que no presento una actividad antimicrobiana con los microorganismos enfrentados, tal vez la preparación de extractos alcohólicos con la corteza de la planta o de compuestos químicos derivados de la planta serían la mejor opción para evaluar su actividad antimicrobiana.

## CONCLUSIONES

La composición química del aceite esencial extraído de las hojas de *Cinchona pubescens* Vahl. realizada mediante un análisis HPLC detectó la presencia en mayor porcentaje del fitol (36,98 %), n-Tetratetracontano (9,38 %) y heneicosano (6,69 %). Además, el aceite esencial extraído de las hojas de *Cinchona pubescens* no presenta actividad antioxidante de importancia por los métodos DPPH, ABTS y FRAP; del mismo modo en que no presenta actividad antimicrobiana ni anti-*Candida albicans* contra los microorganismos estudiados como son *S. mutans*, *E. faecalis* y *C. albicans*. De este modo, se observa que la especie estudiada presenta componentes antimicrobianos y antioxidantes no volátiles, que pueden ser extraídos con solventes líquidos, mas no forman parte de su aceite esencial.

## AGRADECIMIENTO

Al Vicerrectorado Académico de Investigación y Posgrado de la UNMSM por el apoyo brindado en el desarrollo del proyecto "**Composición química, actividad antioxidante, anti-*Candida* y antibacteriana in vitro del aceite esencial de las hojas de *Cinchona pubescens* Vahl**", con código: **Código A23040861**, conforme a lo establecido en la **Resolución Rectoral N° 006081-R-23.**, que se desarrolló durante el periodo 2023.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gurung P, De P. Spectrum of biological properties of Cinchona alkaloids: A brief review. J Pharmacogn Phytochem JPP [Internet]. 2017;6<sup>4</sup>:162-6. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/b853/ee715aee833b4357b595e3f93a6c29489093.pdf>
2. Remuzgo J, Alvarez J, Sales F, Valdivieso G. Caracterización taxonómica y fitoquímica de *Cinchona pubescens* y *Ladenbergia oblongifolia* en el ámbito del valle Alto Huallaga - Región Huánuco. REBIOL. 2020;40<sup>2</sup>:242-55.
3. Ravishankara MN, Harish Padh RM. Antioxidant activity of *Cinchona officinalis* stem bark extracts. Orient Pharm Exp Med. 2003;3<sup>4</sup>:205-11.
4. Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. Analyst. 2002;127<sup>1</sup>:183-98.
5. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 2010;15<sup>10</sup>:7313-52.
6. Noriega P, Sola M, Barukcic A, Garcia K, Osorio E. Cosmetic Antioxidant Potential of Extracts from Species of the *Cinchona Pubescens* (Vahl). Int J Phytocosmetics Nat Ingredients. 2015;2<sup>1</sup>:14.

7. Al-Mustafa AH, Al-Thunibat OY. Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. Vol. 11, Pakistan Journal of Biological Sciences. 2008. p. 351-8.
8. Muthamil S, Balasubramaniam B, Balamurugan K, Pandian SK. Synergistic effect of quinic acid derived from *Syzygium cumini* and undecanoic acid against candida spp.. Biofilm and virulence [Internet]. Frontiers in microbiology. U.S. National Library of Medicine; 2018 [cited 2023Jan29]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6275436/>
9. Niño J, Espinal C, Mosquera O, Correa Y. Antimycotic Activity of 20 Plants from Colombian Flora, Pharmaceutical Biology. 2003; 41:7, 491-496, DOI: 10.1080/13880200308951341
10. Shinde CH, Anand PK, Kunchiraman BN et.al. In Vitro Study for the Anti-Candida Activity of Homoeopathic Medicines against *Candida Albicans*. Int J Heal Sci Res [Internet]. 2018 [cited 2022 Nov 10];8(9):57–61. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/333421631>
11. Ramić A, Skočibušić M, Odžak R, Čipak Gašparović A, Milković L, Mikelić A, et al. Antimicrobial activity of quasi-enantiomeric cinchona alkaloid derivatives and prediction model developed by Machine Learning [Internet]. Antibiotics (Basel, Switzerland). U.S. National Library of Medicine; 2021 [cited 2023Jan29]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8229948/>
12. Peñarreta J, Manzano P, Santos E. *Cinchona pubescens* (Cascarilla), Native Species from the Andes Mountains of South America. In: Medicinal Plants of Ecuador. CRC Press; 2023. p. 195–201.
13. Radiastuti, N., Mutea, D., & Sumarlin, L. O. Endophytic *Colletotrichum* spp. from *Cinchona calisaya* wedd. and its potential quinine production as antibacterial and antimalaria. AIP Conference Proceedings 1813. 2017. <https://doi.org/10.1063/1.4975960>
14. Yi Y, Zhang QW, Li SL, Wang Y, Ye WC, Zhao J, et al. Simultaneous quantification of major flavonoids in “bawanghua”, the edible flower of *Hylocereus undatus* using pressurised liquid extraction and high performance liquid chromatography. FoodChem. 2012;135<sup>2</sup>:528–33.
15. Liu Y, Zhang H, Wei S. Ultrasonic-assisted extraction of pigments from *Hylocereus undatus* flowers: Optimization, antioxidant activity, and HPLC analysis. RSC Adv.2015;5<sup>58</sup>:46598–607.
16. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999; 26: 1231 - 1237.
17. Mesa-Vanegas AM, Zapata-Uribe S, Arana LM, Zapata IC, Monsalve Z, Rojano B. Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L.. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2015;14<sup>1</sup>:1-10.
18. Benzie F, Strain J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. In ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 1996 ; Vol. 239.
19. de Oliveira EC, Fontes Silva MF, Souza Ramos C. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Piper marginatum* leaves obtained by hydrodistillation in pH4, pH7 and pH10. Revista de la Academia Colombiana de

- Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 2022;46<sup>181</sup>:1002-1009. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1736>
20. Thejanuo Rhetso, R. Shubharani, M. Roopa, V. Sivaram. Chemical constituents, antioxidant, and antimicrobial activity of *Allium chinense* G. Don. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2020 Nov 27 [cited 2023 Dec 14];6<sup>1</sup>. Available from: <https://fjps.springeropen.com/articles/10.1186/s43094-020-00100-7>
  21. V. Vanitha, Vijayakumar S, M. Nilavukkarasi, V.N. Punitha, E. Vidhya, Praseetha PK. Heneicosane—A novel microbicidal bioactive alkane identified from *Plumbago zeylanica* L. *Industrial Crops and Products* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Dec 14];154:112748–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669020306658>
  22. Rojas JJ, Ochoa VJ, Ocampo SA et al. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complement Altern Med*. 2006; 6, 2. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-2>
  23. Antika LD, Triana D, Ernawati T. Antimicrobial activity of quinine derivatives against human pathogenic bacteria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020. 462.
  24. Ramić A, Skočibušić M, Odžak R, Čipak-Gašparović A, Milković L, Mikelić A, et al. Antimicrobial Activity of Quasi-Enantiomeric Cinchona Alkaloid Derivatives and Prediction Model Developed by Machine Learning. *Antibiotics* (Basel). 2021; 31;10<sup>6</sup>:659. doi: 10.3390/antibiotics10060659.
  25. Mohammadi MR, Niaraki ER. Antibacterial, antiviral, and antifungal activities of quinine and its derivatives: A narrative mini-review. *Micro Nano Bio Aspects*. 2023; 2<sup>3</sup>: 1-6. doi: <https://doi.org/10.22034/mnba.2023.399582.1034>

# DECOLORACIÓN DE EFLUENTES TEXTILES QUE CONTIENEN COLORANTES REACTIVOS MEDIANTE EL MÉTODO DE ELECTRO-OXIDACIÓN CON ELECTRODOS DE TITANIO

Teodardo J. Cárdenas Mendoza<sup>\*a</sup>, Maria Quinto Sánchez<sup>b</sup>, Emilia G. Hermoza Guerra<sup>b</sup>, Carmen L. Uribe Valenzuela<sup>c</sup>

## RESUMEN

En este trabajo de investigación se aplicó el método electro-oxidación para la decoloración de los efluentes reales y simulados provenientes de los procesos de teñido del algodón con colorantes reactivos, este método fue aplicado utilizando electrodos tipo malla, el cátodo de titanio y el ánodo de titanio recubierto con rutenio e iridio. Se utilizaron dos tipos de reactores, de un compartimiento y compartimiento doble separado con membrana de intercambio, con el fin de comparar el desempeño electroquímico en la decoloración de efluentes textiles que contienen colorantes reactivos (Corafix Blue Mers 150%, Corafix Golden Yellow Mer 150% y Corafix Red Me-4B 150%).

Durante los ensayos de decoloración, se realizó el seguimiento del contenido de colorante y cloro mediante espectrofotometría UV-visible. En las pruebas de laboratorio se trató el efluente simulado a la concentración de 300 mg/L de colorante rojo, siendo el reactor de dos compartimientos más eficiente con 95.9% de decoloración. En las pruebas piloto se logró decolorar 99.1% al efluente real. Finalmente se reusó el efluente real tratado en una prueba de teñido, obteniendo resultados de color aceptables en la industria textil.

**Palabras clave:** Electro-oxidación, efluentes textiles, colorantes reactivos, electrodo de titanio, reúso.

## DECOLORIZATION OF TEXTILE EFFLUENTS CONTAINING REACTIVE DYES USING THE ELECTRO-OXIDATION METHOD WITH TITANIUM ELECTRODES

### ABSTRACT

In this research, the electro-oxidation method was applied to decolorize real and simulated effluents from cotton dyeing processes with reactive dyes, this method was applied using mesh type electrodes, the titanium cathode and the titanium anode coated with ruthenium and iridium. Two types of reactors were used, one-compartment and separated double-compartment with exchange membrane, to compare the electrochemical performance in

---

<sup>a</sup> Escuela Profesional de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú, tcardenasm@uni.edu.pe

<sup>b</sup> Escuela Profesional de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú.

<sup>c</sup> Escuela Profesional de Ingeniería Textil de la Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú.



the decolorization of textile effluents containing reactive dyes (Corafix Blue Mers 150%, Corafix Golden Yellow Mer 150% and Corafix Red Me-4B 150%).

During discoloration tests, the dye and chlorine content was monitored using UV-visible spectrophotometry. In the laboratory tests, the simulated effluent was treated at a concentration of 300 mg/L of red dye, with the two-compartment reactor being more efficient with 95.9% decolorization. In the pilot tests, 99.1% of the real effluent was decolorized. Finally, the real treated effluent was reused in a dyeing test, obtaining acceptable color results in the textile industry.

**Key words:** Electro-oxidation, textile effluents, reactive dye, titanium electrode, reuse.

## INTRODUCCIÓN

La industria textil consume grandes cantidades de agua en sus operaciones de teñido y acabado<sup>1</sup>. Los efluentes de la industria textil presentan una variedad de contaminantes cuyos parámetros característicos son: color (1100-4500 unidades), demanda química de oxígeno (800-1600 mg/L), pH alcalino (9-11) y sólidos totales (6000-7000 mg/L)<sup>2</sup>. Los colorantes reactivos son los más utilizados en el teñido de sustratos textiles de celulosa, ellos generan efluentes problemáticos debido al bajo poder de agotamiento y fijación en la fibra, por consiguiente, el colorante no fijado se encuentra en altas concentraciones en los efluentes textiles.

Los procesos de oxidación avanzada (PAO's) como las técnicas electroquímicas basadas en la electrólisis del efluente son una alternativa promisoría que se viene investigando para el reúso del efluente en los procesos textiles<sup>3</sup>. La decoloración se logra por la oxidación de la molécula del colorante, ruptura del enlace azo y posterior mineralización<sup>4</sup>. En el Perú se ha investigado la decoloración de efluentes textiles aplicando los siguientes métodos: adsorción con carbón activado<sup>5</sup>, coagulación con coagulantes naturales<sup>6</sup>, tratamiento biológico<sup>7</sup>, fotocatalisis<sup>8</sup> y procesos de oxidación avanzada<sup>9</sup>. En la mayoría de los casos se trabajó a nivel de laboratorio y con colorantes individuales, siendo poca la experiencia con efluentes reales.

Respecto a la decoloración por el método de electro-oxidación hay experiencia con diversos colorantes<sup>10</sup> y reactores<sup>11</sup>.

## PARTE EXPERIMENTAL

Las pruebas se realizaron en el Laboratorio N° 21 de la Facultad de Ingeniería Química y Textil de la Universidad Nacional de Ingeniería. Se construyeron tres reactores, se ensayaron dos efluentes simulados (colorante único y tricromía) y un efluente real y se utilizó una fuente de corriente continua.

### Reactores de electro-oxidación

El reactor R1, tenía un compartimiento de 500 mL de volumen efectivo dentro del cual se ubicaron los electrodos, ver Figura 1.a.

El reactor R2, tenía dos compartimientos, de 400 mL de volumen efectivo cada uno. El primer compartimiento, anódico, donde se colocó la solución a tratar; y el otro, catódico, donde se colocó la solución salina a la misma concentración que la solución a tratar, separados mediante una membrana de intercambio catiónico que fue adquirida de la empresa "Membranes International Inc.", la cual tiene un área de 36 cm<sup>2</sup>, ver Figura 1.b.

En ambos reactores los electrodos que se utilizaron fueron tipo malla: como cátodo, dos electrodos de titanio y como ánodo, dos electrodos DSA de titanio recubiertos con rutenio e iridio, estos electrodos fueron adquiridos de la empresa “Sophia's wholesale titanium,nickel,tantalum”, los cuales están recubiertos 1.1 mm por ambos lados. área total de 50 cm<sup>2</sup>.

Disposición de electrodos: Ánodo-Ánodo/membrana/Cátodo-Cátodo, distancia entre electrodos de 2 cm, intensidad de corriente 0.5 A, densidad de corriente 1 A/dm<sup>2</sup> y un tiempo de 30 minutos.

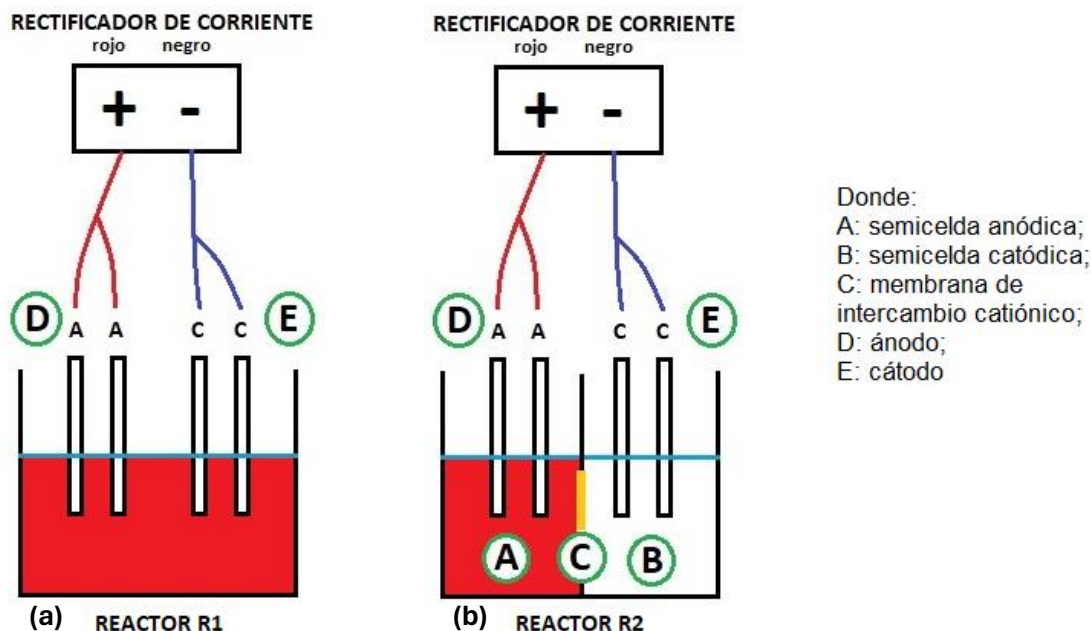
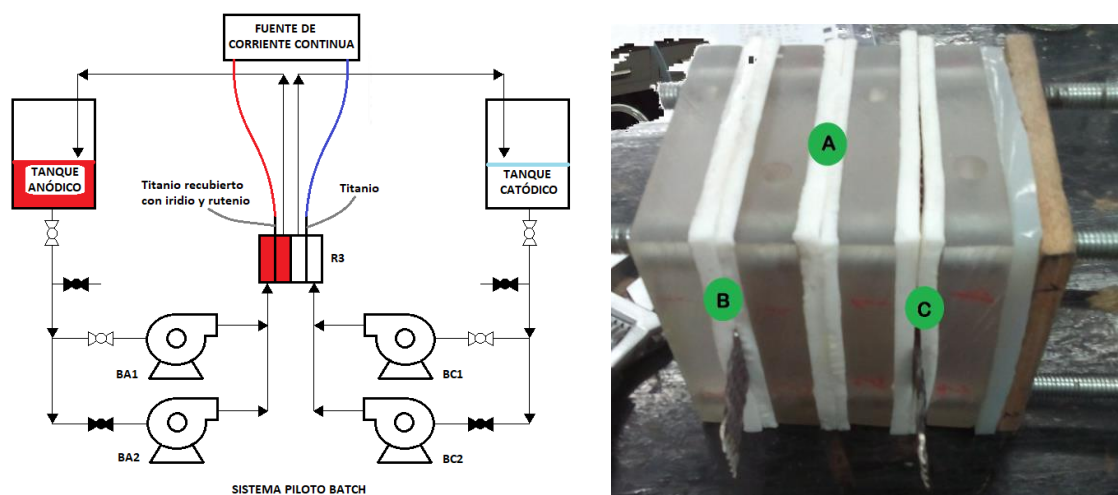


Figura 1. Esquemas de reactores: (a) Reactor R1. (b) Reactor R2

El reactor piloto R3, se basó en el diseño del reactor R2 con la mejora de capacidad aumentada en un sistema de flujo circulante. Este reactor estuvo formado de cuatro capas rectangulares de resina sólida translúcida intercaladas con capas de silicona, formando dos compartimientos mediante la membrana de intercambio catiónico. Los electrodos fueron los mismos utilizados en los reactores anteriores. El efluente a tratar se colocó en el compartimiento anódico y la solución salina en el compartimiento catódico, ver Figura 2.a. Las soluciones suministradas al reactor R3 fueron descargadas desde dos recipientes de 20 L cada uno, mediante un sistema de bombas a un caudal fijo de 78 mL/s y válvulas manuales conectadas al reactor mediante mangueras, ver Figura 2.b.



**Figura 2.** (a). Esquema del sistema batch de electro-oxidación. (b) Reactor R3. Dónde: A: membrana de intercambio catiónico, B: ánodo (solución a tratar), C: cátodo.

### Preparación de los efluentes textiles con colorante reactivo, simulados y reales

Se prepararon dos efluentes simulados, además de contar con un efluente real. La formulación del efluente simulado de color rojo fue: 300 mg/L colorante reactivo Corafix Red ME-4B 150%, 50 g/L NaCl y la cantidad necesaria de NaOH para alcanzar valores de pH de 10 a 12.

El efluente real procedía de un proceso de teñido isotérmico a 60 °C por 60 minutos, el cual contenía 1% de cada colorante reactivo, Corafix Blue MERS 150%, Corafix Golden Yellow MERS 150% y Corafix Red ME-4B 150%, NaCl, NaOH para ajustar el pH y los siguientes auxiliares de teñido: secuestrante (Rucoquest 100-P), antiqiebre (Rucolin RSO), igualante (Rucogal EDR), buffer (Ruco control) y Ruco dye (alcaligeno).

La solución salina que se utilizó en el compartimiento catódico de los reactores R2 y R3 se elaboró con 50 g/L de NaCl.

### Caracterización de los efluentes textiles con colorante reactivo, simulados y reales

El efluente simulado de color rojo se caracterizó mediante espectroscopía UV-visible<sup>12</sup> a las concentraciones de 4, 8, 10, 20, 40, 60 y 80 mg/L, pH 4, 7 y 10, con la adición de sal (20 g/L) y auxiliares de teñido que se utilizaron en el efluente real.

Se correlacionaron los datos de concentración vs. absorbancia a la longitud 530 nm con la ecuación de la ley de Lambert-Beer.

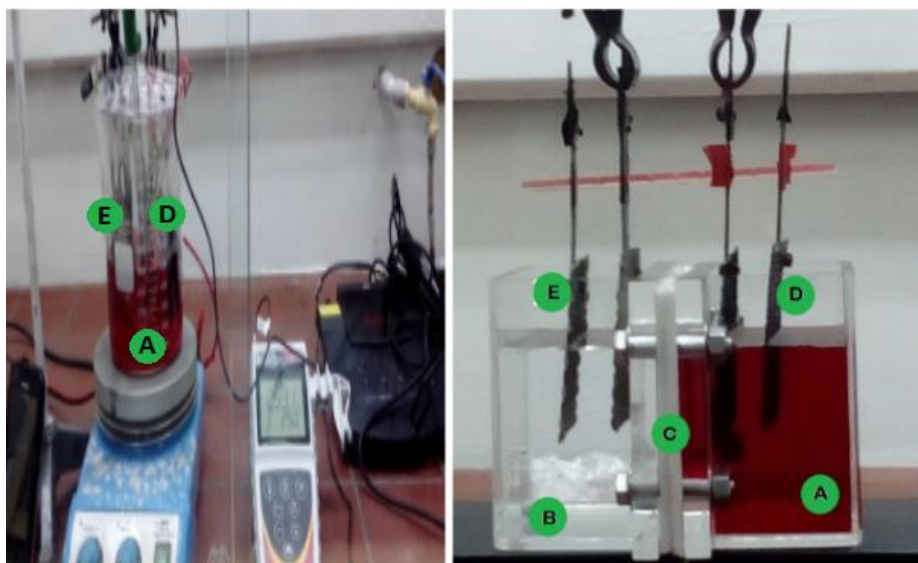
Del mismo modo se caracterizó la solución estándar de cloro con reactivo DPD<sup>13</sup> mediante espectroscopía UV-visible y se elaboró la curva de concentración vs. absorbancia para confirmar la ley de Lambert-Beer.

Además, se midieron el pH, conductividad, turbidez, sólidos suspendidos totales (SST) y demanda química de oxígeno (DQO) de los efluentes antes y después del proceso de decoloración.

En el caso del efluente real se obtuvieron los espectros de absorción UV-visible, se midieron el pH, conductividad, turbidez, sólidos suspendidos totales (SST) y demanda química de oxígeno (DQO), antes y después del proceso de decoloración.

### Decoloración del efluente textil a nivel laboratorio

La decoloración consistió en el tratamiento del efluente simulado mediante el método de electro-oxidación en los reactores R1 y R2 y sus condiciones ya descritas. Los arreglos en los reactores R1 y R2 se muestran en la Figura 3.



**Figura 3.** (a) Reactor R1. (b) Reactor R2. Donde: A: efluente, B: solución salina, C: membrana de intercambio iónico, D: ánodo de titanio recubierto con rutenio e iridio, E: cátodo de titanio.

### Decoloración del efluente textil a nivel piloto

El efluente simulado de tricromía y el efluente real fueron tratados en el reactor R3, la distribución de los electrodos es similar a la utilizada en el reactor R2. En la Tabla 1 se muestran las condiciones de trabajo del reactor.

**Tabla 1.** Condiciones de las pruebas en el reactor R3

Parámetro	Prueba 1	Prueba 2
Efluente	Simulado	Real
Pares de electrodos	1	1
Separación de electrodos, cm	6	6
Área de electrodo, dm <sup>2</sup>	0.36	0.36
Intensidad de corriente, A	0.5	1
Densidad de corriente, A/dm <sup>2</sup>	1.39	2.78
Membrana de intercambio	Si	Si
Tiempo, min	60	210

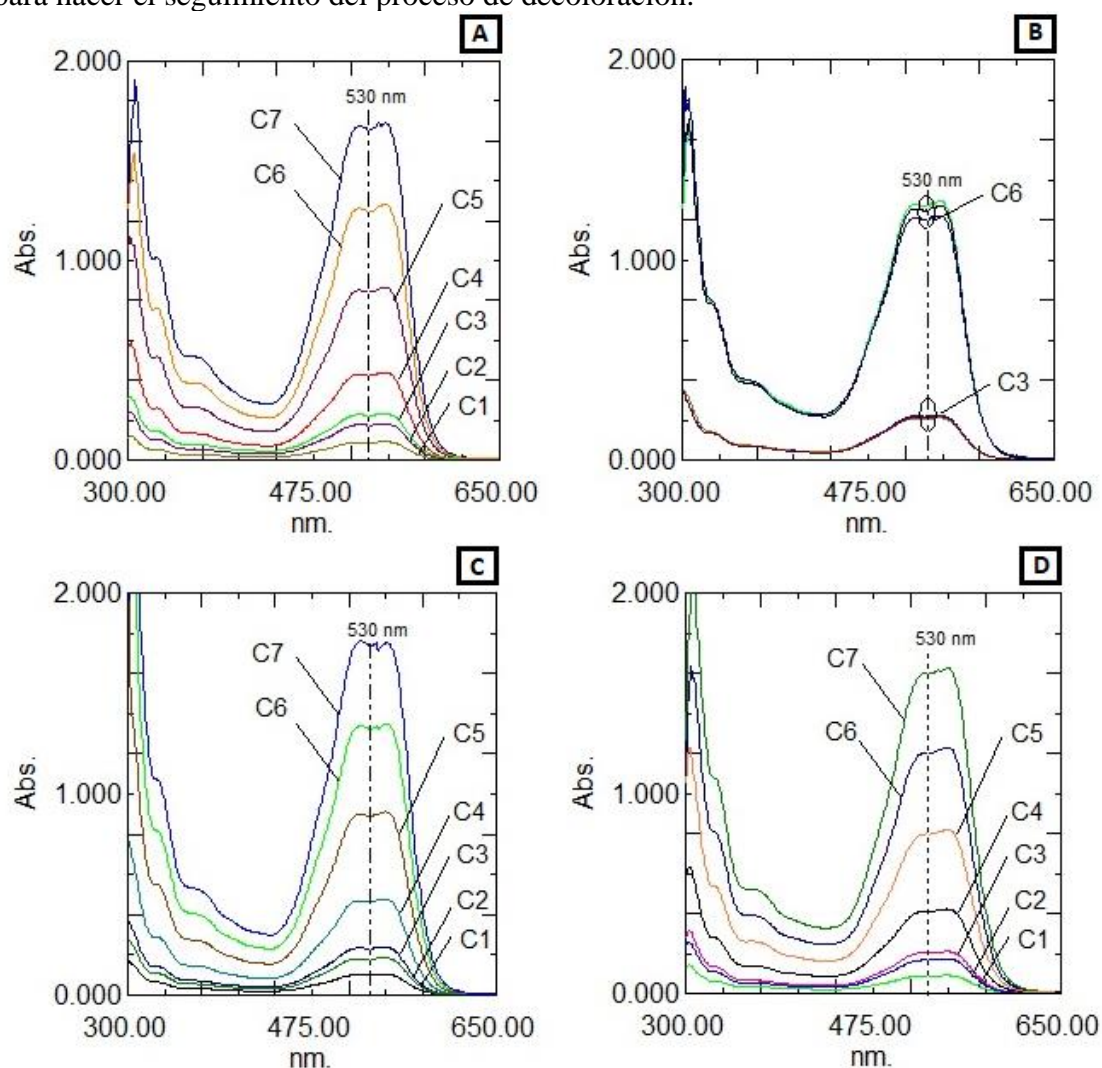
### Reúso en un proceso de teñido

El efluente real tratado en el reactor R3, se filtró y eliminó el cloro previo a ser reutilizado en teñido de algodón con 0.5% de colorante azul reactivo Corafix Blue MERS 150%, el proceso de tintura fue isotérmico a 60 °C por 60 minutos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de efluente simulado y real

Se observa, en las Figuras 4.a y 4.b, que los espectros UV-visible del colorante reactivo C.I. Reactive Red 195 (colorante simulado rojo) presentaron el mismo perfil en el rango de concentraciones y pH ensayados: de 4 mg/L a 80 mg/L, pH 4, 7 y 10. La adición de sal y auxiliares no modificó las longitudes de onda de los picos y valles notables, manteniendo también el mismo perfil, por lo cual se eligió la longitud de onda 530 nm para hacer el seguimiento del proceso de decoloración.



**Figura 4.** Espectros de absorción de efluente simulado con colorante C.I. reactive red 195. (A) variación de concentración. (B) variación de pH. (C) variación de sal. (D) adición de auxiliares. Donde: C1: 4mg/L, C2: 8mg/L, C3: 10 mg/L, C4: 20mg/L, C5: 40mg/L, C6: 60mg/L y C7: 80mg/L.

Se verificó un buen ajuste lineal al relacionar la absorbancia con la concentración (mg/L) según la ley de Lambert-Beer, del efluente con el colorante reactivo C.I. reactivo red 195 (Ecuación 1) y del estándar de cloro (Ecuación 2).

$$\text{Absorción} = 0.01938 * \left( \text{Concentración colorante}, \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \quad R^2 = 0.999 \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\text{Absorción} = 0.13239 * \left( \text{Concentración cloro}, \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \quad R^2 = 0.999 \quad (\text{Ecuación 2})$$

En la Figura 5 se muestran los principales parámetros del efluente simulado rojo y del efluente real antes del tratamiento, así como el espectro UV-visible del efluente real diluido.

**Tabla 2.** Parámetros iniciales del efluente simulado rojo y el efluente real.

Parámetro	Prueba 1	Prueba 2
Efluente	Simulado	Real
pH	10-11	11.5
Conductividad, mS/cm	80	81.1
Temperatura, °C	25-30	34.2
Turbidez, NTU	1.9	172
SST, mg/L	6	169
DQO, mg/L	250-412	2477

## DECOLORACIÓN A NIVEL LABORATORIO

### Pruebas en el reactor R1 y R2

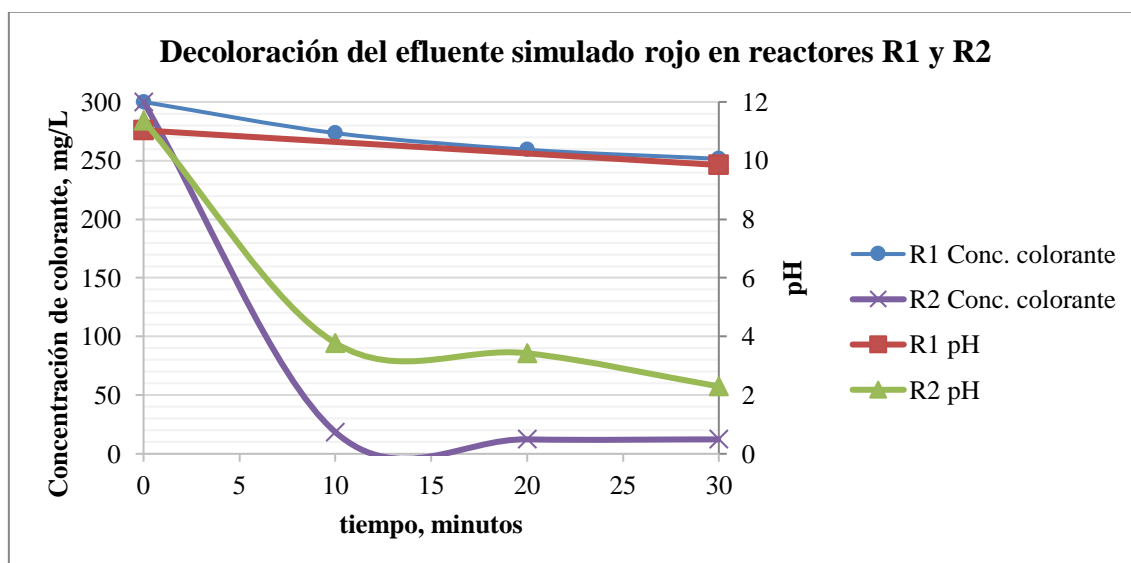
La Tabla 3 muestra la caracterización del efluente simulado rojo antes y después del tratamiento por electro-oxidación de las pruebas. El tiempo de tratamiento fue de 30 minutos a una densidad de corriente continua de 1 A/dm<sup>2</sup> en ambos reactores y se monitorearon las variables de pH, conductividad, ORP, DQO, y concentración de colorante, cloro y sal antes y después del tratamiento. La variación del pH y concentración del colorante durante el tiempo de tratamiento se observa en la Figura 5.

**Tabla 3.** Caracterización del efluente simulado rojo (C.I. reactivo red 195), para 300 mg/L de efluente y 50 g/L de sal durante 30 minutos, densidad de corriente 1 A/dm<sup>2</sup>. Antes y después del tratamiento en el reactor R1 y en el reactor R2

Según los datos de concentración de colorante en la Tabla 3, se determinó que los porcentajes de decoloración para los reactores R1 y R2 fueron 16.2% y 95.9%, respectivamente; en la Figura 5 es notorio que el grado de oxidación del colorante fue

mayor en el reactor R2 durante todo el proceso, lo cual también se observa en la coloración final de los efluentes tratados, ver Figura 6.

Prueba	R1		R2	
	Inicio	Final	Inicio	Final
pH	11.0	9.8	11.4	2.3
ORP (mV)	85.4	-254	80	1125
Sal (g/L)	50	48.6	50	49.9
Concentración de colorante rojo(mg/L)	300	251.6	300	12.4
DQO (mg/L)	250	150	262	100



**Figura 5.** Pruebas en los reactores R1 y R2. Gráfica comparativa de tiempo vs. pH y Concentración de colorante C.I reactive red 195

Esto podría explicarse considerando que el reactor R2 cuenta con una separación de los compartimientos anódico y catódico, lo que evita la neutralización de los iones hidronio que se forman sobre el ánodo, ver ecuaciones 4-8, permitiendo que el pH disminuya más rápido y por consiguiente las especies cloradas predominantes (iones hipoclorito y ácido hipocloroso) puedan oxidar más eficientemente el colorante<sup>14</sup>.

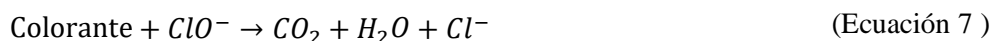
Reacción de reducción (cátodo):



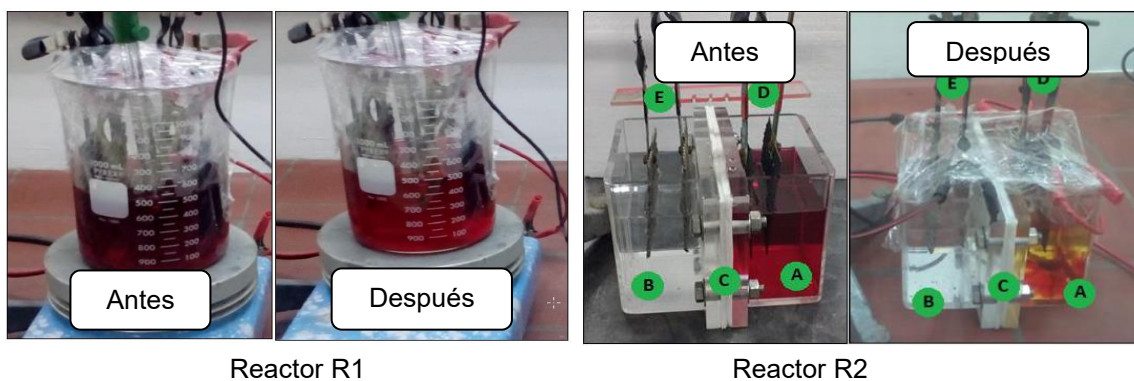
Reacción de oxidación (ánodo):







Reacción de neutralización



**Figura 6.** Pruebas en los reactores R1 y R2. Coloración de la solución antes y después del tratamiento

### Decoloración a nivel piloto

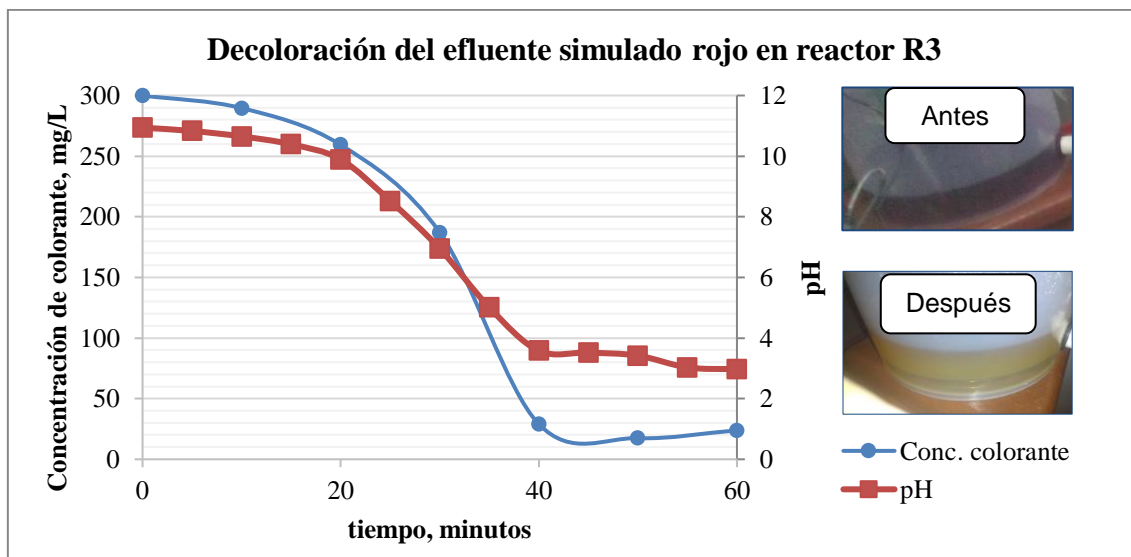
Se utilizó el reactor piloto R3 para tratar efluente simulado y real. En la Tabla 4 se muestran las caracterizaciones del antes y después del tratamiento de electro-oxidación en el reactor R3.

**Tabla 4.** Caracterización del efluente simulado y efluente real con colorante C.I. reactive red 195, antes y después del tratamiento en el reactor R3

Prueba	N°1: Efluente simulado		N°2: Efluente real	
	Inicio	Final	Inicio	Final
pH	11	3.0	11.5	3.8
ORP (mV)	56.4	1099	-19.5	1045
Concentración de colorante rojo(mg/L)	300	23.9	125.6	1.12
Concentración de cloro (mg/L)	0	60.2	0	33.3
DQO (mg/L)	250	150	1537.5	1262.5

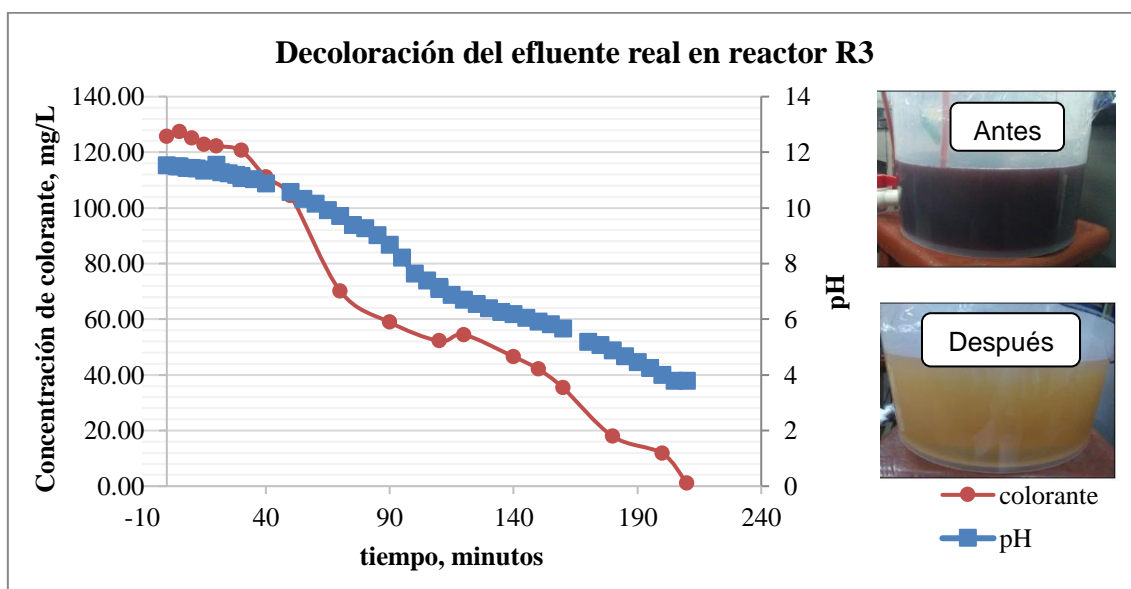
En la primera prueba se trató el efluente simulado rojo donde se obtuvo una eficiencia de decoloración del 92%, con una disminución del 40% de DQO. En la Figura 7 se muestra la variación de concentración del colorante simulado rojo y del pH vs. el tiempo de tratamiento, además del color del efluente antes y después de ser tratado.



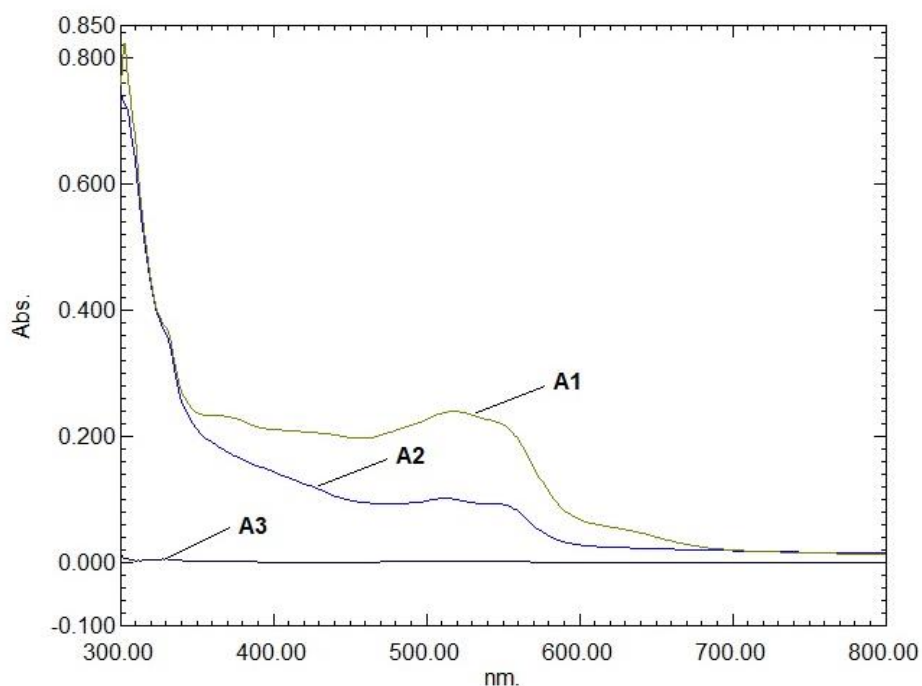


**Figura 7.** Reactor R3 prueba 1. Arriba: gráfica de variación de concentración decolorante y pH. Abajo: Coloración de la solución antes y después del tratamiento.

En la segunda prueba se trató el efluente real de una tricromía donde se obtuvo una eficiencia de decoloración del 99.1%. En la Figura 8 se muestra la variación de concentración del colorante rojo y del pH vs. el tiempo de tratamiento, además del color del efluente antes y después de ser tratado.



**Figura 8.** Reactor R3 prueba 2. Arriba: gráfica de variación de concentración de colorante y pH. Abajo: Coloración de la solución antes y después del tratamiento

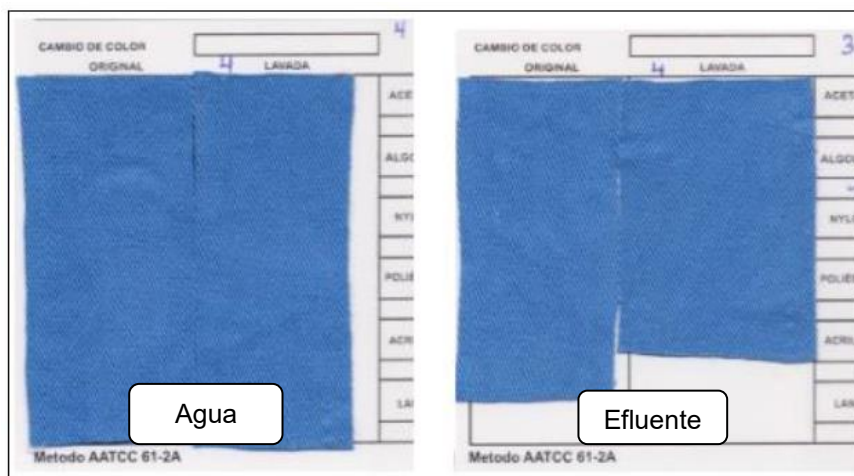


**Figura 9.** Espectro de absorción UV-visible del efluente real, R3 prueba 2. Donde A1: Efluente real diluido 2/25 (inicial), A2: Efluente tratado después de 140 minutos, A3: Efluente tratado final, después de 210 minutos (final)

### Teñido con el efluente tratado

El efluente tratado de la prueba 2 del reactor R3 se acondicionó mediante filtración al vacío y eliminación del cloro remanente con bisulfito de sodio.

Se realizó el teñido de una tela de algodón con 0.5% de colorante reactivo Corafix Blue MERS 150% utilizando efluente acondicionado. Simultáneamente se hizo una tintura estándar con agua virgen utilizando el mismo porcentaje de colorante. Se midió el color de las telas utilizando un espectrofotómetro de reflectancia marca Data Color modelo SF550, el valor de la diferencia de color obtenido fue DECMC:1.06, cercano a 1.00, tolerancia máxima aceptado en la industria textil. Los colores obtenidos se muestran en la Figura 10.



**Figura 10:** Telas teñidas. Izquierda: teñido con agua virgen. Derecha: teñido con efluente real tratado en el reactor R3, prueba 2

## CONCLUSIONES

Es posible decolorar hasta un 99.1% un efluente textil real procedente de la tintura de algodón con colorante reactivos, mediante la electro-oxidación en un reactor piloto batch de flujo circulante con cátodo de titanio y ánodo de titanio recubierto con iridio y rutenio. Es posible utilizar el efluente decolorado por electro-oxidación para un nuevo proceso de tenido y obtener resultados de color aceptables dentro de la tolerancia máxima usada en la industria textil.

A nivel laboratorio el reactor R2 (dos compartimientos) es más eficiente en la decoloración del colorante C.I. Reactive red 195 que el reactor R1 (un compartimiento), siendo la eficiencia de decoloración de 95.9% y de 16.2%, respectivamente.

Se valida que la espectrofotometría puede ser utilizada como método de seguimiento de la decoloración del colorante reactivo C.I. Reactive red 195.

## AGRADECIMIENTO

Al Vicerrectorado de Investigación por la subvención otorgada para la ejecución del presente proyecto. al Dr. Adolfo La Rosa, por su apoyo y el préstamo de equipos de laboratorio y al equipo de investigación del proyecto interdisciplinario 2016-1 de la Universidad Nacional de Ingeniería por su apoyo en la realización de las pruebas experimentales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asociación Peruana de Técnicos Textiles, (último acceso 10 octubre 2023). Disponible en <http://apttperu.com/tenido-disperso-sin-agua/>
2. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, (último acceso 10 octubre 2023). Disponible en <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/prepa4/n3/e1.html>

3. Gutierrez, MC, et al. "Reutilización de aguas residuales decoloradas mediante un tratamiento electroquímico." XVIII Congreso Latino americano de química Têxtil. 2006.
4. M. Mercè Vilaseca Vallvè, "Eliminación del color de las aguas residuales procedentes de la tintura con colorantes reactivos" tesis para optar el título de doctor en la Universidad Politècnica de Catalunya, 2015.
5. Emilia G. Hermoza Guerra, Luis M. Sierra Flores, "Proceso de decoloración de los efluentes del teñido de algodón mediante carbón activado en una columna empacada", tesis para optar por el título de ingeniero químico, Universidad Nacional de Ingeniería, 2019.
6. Noemi Y. Diaz Ponceca, Carmen R. Lino Matos, Ruth Quispe Huaytalla, "Uso del quitosano como coagulante natural para el tratamiento de efluentes generados por la industria textil caso: Compañía Universal Textil S.A.", tesis para optar por el título de ingeniero ambiental y de recursos naturales, Universidad Nacional del Callao, 2018.
7. Karen L. Orozco Romero, "Biodegradación de colorante azul directo por consorcios bacterianos aislados de un efluente textil de Lima, Perú", tesis para optar el título Bióloga Microbióloga Parasitóloga, Universidad Mayor de San Marcos, 2018.
8. Armando Aquino Tacza, "Tratamiento de aguas residuales de la industria textil artesanal por fotocatalisis homogénea y heterogénea", tesis para optar el título de maestría en ingeniería ambiental, Universidad Nacional del Centro del Perú, 2017.
9. C. Gamarra & A. La Rosa-Toro, "Decoloración del anaranjado de metilo empleando el sistema Fenton". Sociedad Química del Perú, 2014, 80<sup>1</sup>, 21-34.
10. Aravind, Priyadharshini, et al. "An integrated (electro-and bio-oxidation) approach for remediation of industrial wastewater containing azo-dyes: understanding the degradation mechanism and toxicity assessment." *Journal of hazardous materials* 318 (2016): 203-215.
11. V. Vijayakumar, R. Saravanathamizhan, N. Balasubramanian, "Electro oxidation of dye effluent in a tubular electrochemical reactor using TiO<sub>2</sub>/RuO<sub>2</sub> anode", *Journal of Water Process Engineering (Elsevier)*, 9 (2016), 155-160.
12. APHA, AWWA, y WEF, *Standard Methods, Standard methods for the examination of water and wastewater*, 22th, 2012.
13. HACH company, "Chlorine, Free and Total, High Range, DPD Method 10069 (free)/10070 (total), Powder Pillows, Pocket Colorimeter II" DOC316.53.01490, 04 de 2014.
14. Carlos A. Martínez-Huitle, Enric Brillas, "Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: A general review", *Applied Catalysis B: Environmental journal*, 87 (2009) 105-145

# DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE SECRECIÓN DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE EN LA LEVADURA *S. CEREVISIAE* MEDIANTE ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO Y DETECCIÓN POR WESTERN BLOT

Sandy Nelly Mansilla García<sup>a,b</sup>, Ana Akemi Kitazono Sugahara<sup>\*a,c</sup>

## RESUMEN

En este trabajo se determinaron los niveles de secreción conferidos por dos diferentes mecanismos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, aplicados a la enzima glutatión S-transferasa (GST) y mediante ensayos de electroforesis y Western blot (o transferencia Western). Se construyeron previamente plásmidos que permiten la producción de dos tipos de GST fusionadas con sendas secuencias que facilitan su secreción (péptidos de señal, PS): el PS-Alfa (derivado del factor de apareamiento alfa) y un PS-sintético (diseñado a partir de secuencias de consenso derivadas de proteínas que son eficientemente secretadas en la levadura). Después de la separación electroforética de las muestras de proteínas intracelulares y extracelulares, se realizó un ensayo de Western blot que permitió la detección específica de GST mediante un anticuerpo monoclonal. Los ensayos permitieron la identificación de varias formas de GST, en su forma procesada extracelular (26 kDa) y otras de mayor tamaño, siempre intracelulares, dependiendo del péptido señal (PS) utilizado. Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles extracelulares de GST, demostrando que con las condiciones aplicadas, ambos péptidos señal son similarmente eficientes en la promoción de la secreción de proteínas.

**Palabras clave:** inmunoblotting, glutatión S-transferasa (GST), levadura *Saccharomyces cerevisiae*, niveles de secreción, secreción enzimática, péptido señal alfa, péptido señal sintético.

## DETERMINATION OF THE SECRETION EFFICIENCY OF A RECOMBINANT PROTEIN IN THE YEAST *S. CEREVISIAE* BY ELECTROPHORETIC ANALYSIS AND WESTERN-BLOT DETECTION

### ABSTRACT

The main goal of this work was to investigate the secretion levels that can be achieved when using two different mechanisms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the enzyme glutathione S-transferase (GST), and via electrophoresis and Western-blot

<sup>a</sup> Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis – Facultad de Ciencias – Universidad Nacional Agraria La Molina Av. La Molina s/n – La Molina – Lima 15024 – Perú, [anakitazono@lamolina.edu.pe](mailto:anakitazono@lamolina.edu.pe)

<sup>b</sup> Departamento Académico de Biología – Facultad de Ciencias – Universidad Nacional Agraria La Molina.

<sup>c</sup> Departamento Académico de Química – Facultad de Ciencias – Universidad Nacional Agraria La Molina.

assays. The respective plasmids were previously constructed, which allowed the production of the GST enzyme fused to two different secretion signals (signal peptides, SP): the alpha SP (derived from the alpha mating factor) and a synthetic SP (designed from consensus sequences derived from proteins that are known to be efficiently secreted in yeast). After the intracellular and extracellular protein fractions were separated by electrophoresis, a Western blot assay was performed using a monoclonal anti-GST antibody for the specific detection of the protein. These assays allowed the identification of several intracellular forms of GST with diverse sizes depending on the SP, but only the mature 26 kDa form was found in the extracellular fraction. However, no difference was observed on the extracellular levels of GST, which indicated that, under the applied conditions, both SPs are similarly efficient promoting protein secretion.

**Key words:** immunoblotting, glutathione S- transferase (GST), yeast *Saccharomyces cerevisiae*, secretion levels, enzyme secretion, alpha signal peptide, synthetic signal peptide.

## INTRODUCCIÓN

*Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo ampliamente utilizado en investigación y en procesos biotecnológicos gracias a que presenta ventajas como rápido crecimiento, fácil cultivo y manipulación genética, y un simple pero eficiente sistema de secreción de proteínas<sup>1-3</sup>. Esta última característica es muy importante para su aplicación a nivel industrial y de investigación porque facilita la etapa de purificación de proteínas. Por esta razón se han desarrollado numerosas investigaciones buscando optimizar el rendimiento de secreción proteica<sup>4,5</sup>. Para lograr que una proteína sintetizada en la célula sea secretada, es necesaria la presencia de una secuencia de péptido señal (PS), cuya secuencia codificante puede estar incluida en el plásmido de expresión. Varios investigadores han demostrado que la eficacia de secreción de una proteína depende en parte de la secuencia del PS, la que puede optimizarse originando los llamados PS sintéticos<sup>5,6</sup>. Importantemente, el efecto de un PS sobre la secreción de una proteína debe, necesariamente, ser determinado experimentalmente.

Este estudio tuvo como finalidad determinar los niveles de secreción que pueden alcanzarse al usar dos tipos de PS. El primero es un PS nativo, PS-alfa, derivado de la proteína usada por *S. cerevisiae* como un factor de apareamiento durante la reproducción sexual. El segundo PS es denotado como "sintético" (PS-sintético) ya que es una secuencia optimizada diseñada a partir de las proteínas Yps1/Yap3/TA57, las cuales son secretadas eficientemente en la levadura<sup>5</sup>. Para determinar los niveles de secreción con los dos tipos de PS, se empleó a la enzima glutatión S-transferasa (GST), que cataliza la conjugación de glutatión a compuestos xenobióticos para promover la desintoxicación. GST es frecuentemente como una etiqueta que permite la eficiente purificación y detección de las respectivas proteínas de fusión<sup>7</sup>. Por esta razón, se han desarrollado múltiples anticuerpos monoclonales que permiten su detección mediante Western blots (immunoblots, transferencia de proteínas), el método aplicado en este estudio<sup>8</sup>. Los ensayos aplicados demostraron que, aunque se presentan diferentes versiones intracelulares de GST, con diferentes tamaños, solo la forma madura y procesada (libre del respectivo péptido señal) puede ser detectada en la fracción extracelular.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales y cepas de levadura

Los plásmidos que permitieron la producción de las proteínas analizadas están listados en la tabla 1<sup>9</sup>. El plásmido original, denotado pJN1, así como la cepa correspondiente (un mutante que es deficiente en la enzima triosa fosfato isomerasa,  $tfi^{NEG}$ ) fueron gentilmente proveídos por el laboratorio del Dr. Jens Nielsen<sup>10</sup>. La cepa  $tfi^{NEG}$  no puede proliferar en medio conteniendo glucosa ya que la deficiencia enzimática causa la acumulación de metilgioxal, un compuesto citotóxico. El plásmido pJN1 incluye como marcador de selección al gen que codifica para la triosa fosfato isomerasa y por tanto, permite el crecimiento de los transformantes que lo incluyen en medio conteniendo glucosa.

**Tabla 1.** Plásmidos pJN1 modificados para este estudio<sup>9</sup>

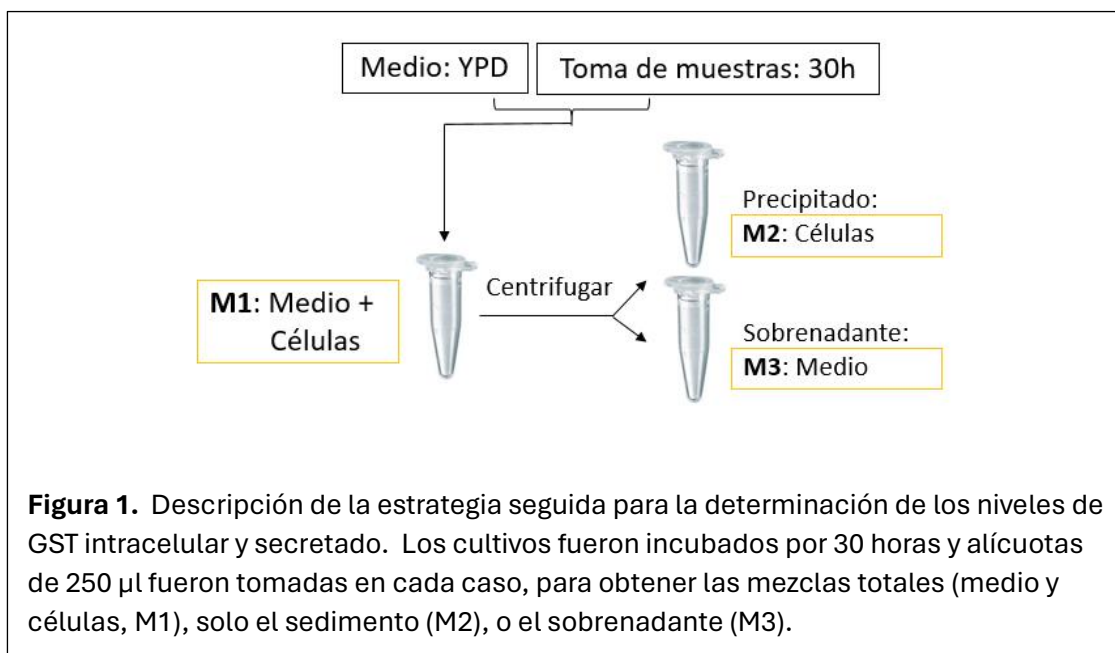
Nombre	Descripción	Uso
pAlfa	Incluye la secuencia codificante para el PS-alfa	Control negativo de secreción
pSint	Incluye la secuencia codificante para el PS-sintético	Control negativo de secreción
pAlfaGST	Incluye la secuencia codificante para GST fusionada al PS-Alfa	Secreción de GST bajo la dirección del PS-alfa
pSintGST	Incluye la secuencia codificante para GST PS-sintético	Secreción de GST bajo la dirección del PS-sintético

### Preparación de las muestras para los ensayos de los niveles de secreción de GST en los transformantes de levadura

Los transformantes  $tfi^{NEG}$  que incluían los plásmidos de secreción fueron inoculados en 20 ml de caldo YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%) a una absorbancia inicial (600 nm) de 0.05. Los cultivos fueron incubados a 30 °C en agitación a 2000 RPM por 30 horas y según se indica en la figura 1, se colectaron las muestras M1 (medio + células), M2 (sólo células) y M3 (sólo sobrenadante). Además de la cepa  $tfi^{NEG}$  Se usaron como controles a los transformantes de una cepa con genotipo W303<sup>11</sup>, que producían GST solo intracelularmente (plásmido pEGH)<sup>12</sup>.

En todos los casos se usó 250  $\mu$ l de cada suspensión celular para la preparación de las muestras a analizar<sup>13</sup>. Para el caso de las muestras M2 (sedimento celular), después de su obtención se lavaron dos veces y luego se re-suspendieron con agua, para obtener un volumen final de 250  $\mu$ l. A cada muestra se le agregó ácido tricloroacético (TCA) hasta alcanzar una concentración de 15%, se agitó y guardó a -20 °C por un día<sup>14</sup>. Pasado este tiempo, se centrifugó a 13500 RPM por 15 min, se desechó el sobrenadante, se hicieron tres lavados con etanol, dejando en cada lavado los tubos en la congeladora por 10 min antes de centrifugar. Después de eliminar el sobrenadante se dejó secar el sedimento a temperatura ambiente.

En caso de las muestras M1 y M2 que incluyen células y para asegurar su ruptura, los sedimentos fueron re-suspendidos en 40  $\mu$ l de una solución conteniendo 1% SDS y 0.1N NaOH, y se agregó 15  $\mu$ l del buffer de muestra concentrado (4X). Para la preparación de



20 ml de esta solución se mezclaron 8.0 ml de 1M Tris-HCl pH 6.8, 1.6 g de SDS, 8.0 ml de glicerol, 4.0 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol, y 40 mg de azul de bromofenol). Las muestras M3 recibieron directamente 55  $\mu$ l del buffer de muestra. Finalmente, todas las muestras fueron tratadas a 96  $^{\circ}$ C por 5 min. Para las separaciones electroforéticas (SDS-PAGE) se siguió un procedimiento similar al descrito por el Dr. Armando Yarlequé y colegas<sup>15,16</sup>.

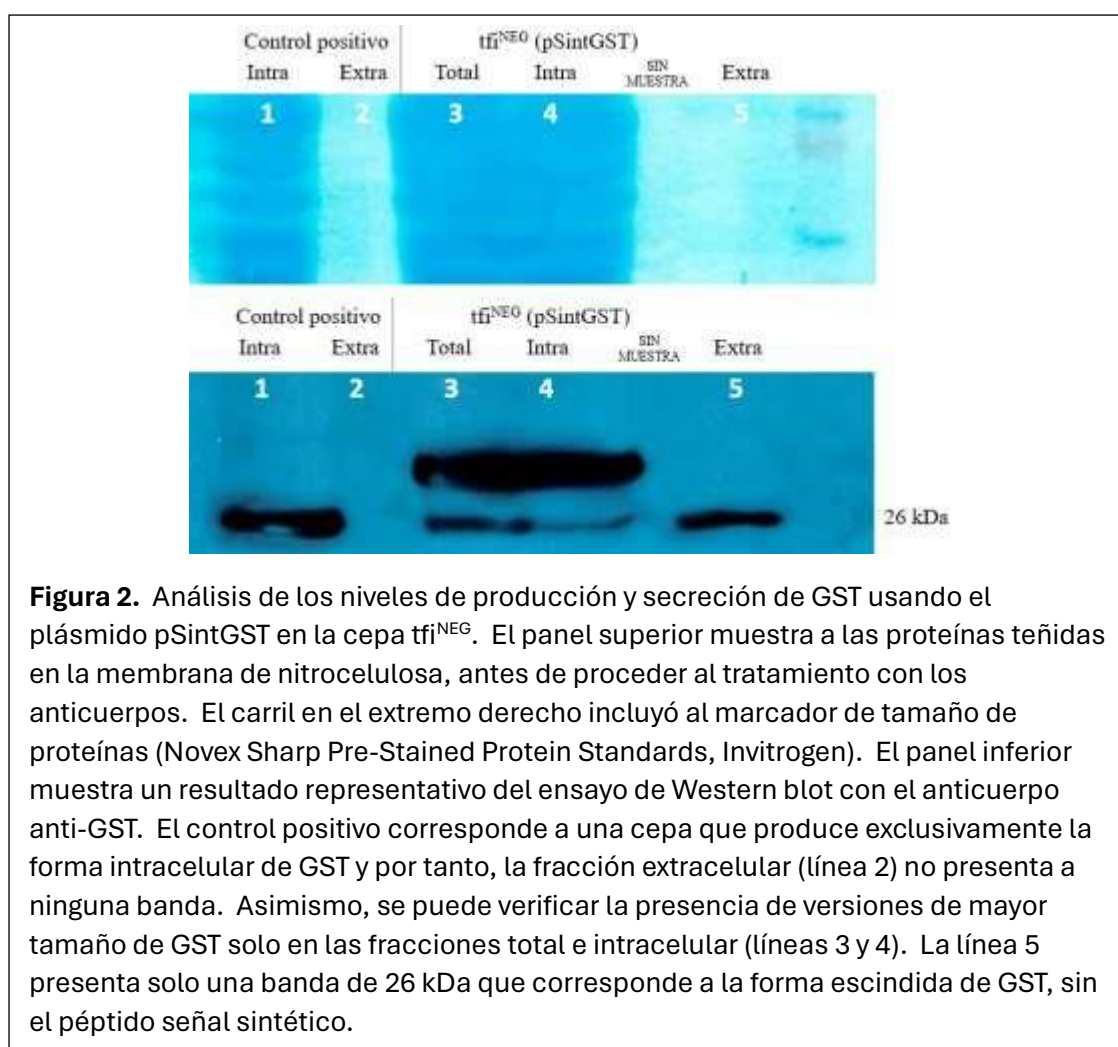
### Separación electroforética y detección de GST mediante Western blot

Se cargaron las muestras preparadas en un gel discontinuo de poliacrilamida-SDS para realizar la electroforesis (15x10 cm, gel de concentración 6%, gel de separación 12%). La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante (55V) por 10 horas. Las proteínas así separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa usando un sistema líquido (buffer TGS conteniendo 20% etanol) a voltaje constante (20V, 12 horas). Para la preparación de 1 litro del buffer TGS, se requiere 14.4 g de glicina, 3.0 g de Tris base, y 0.5 g de SDS. Para comprobar si las transferencias de las proteínas fueron óptimas, las membranas de nitrocelulosa fueron sometidas a tinción de manera reversible con el kit "Memcode" (Thermo Scientific Pierce). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas por 30 min con una suspensión de leche en polvo descremada al 5% en buffer TBS-T 1X (20 mM Tris base, 0.8% NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.6), luego se lavó brevemente con TBS-T 1X. La detección se realizó usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GST (Novagen) diluido 1:5000 y un anticuerpo secundario de cabra conjugado a peroxidasa (1:1000), que reconoce inmunoglobulinas G (IgG) de ratón (ThermoFisher Pierce). Las soluciones de anticuerpos fueron preparadas en la suspensión de leche en polvo descremada al 5% en TBS-T 1X. Ambos tratamientos se realizaron a temperatura ambiente por una hora. Para la detección, se usó un kit de quimioluminiscencia (Pierce) y autoradiografía con 15 minutos de exposición. El revelado de los films de rayos X se realizó manualmente.

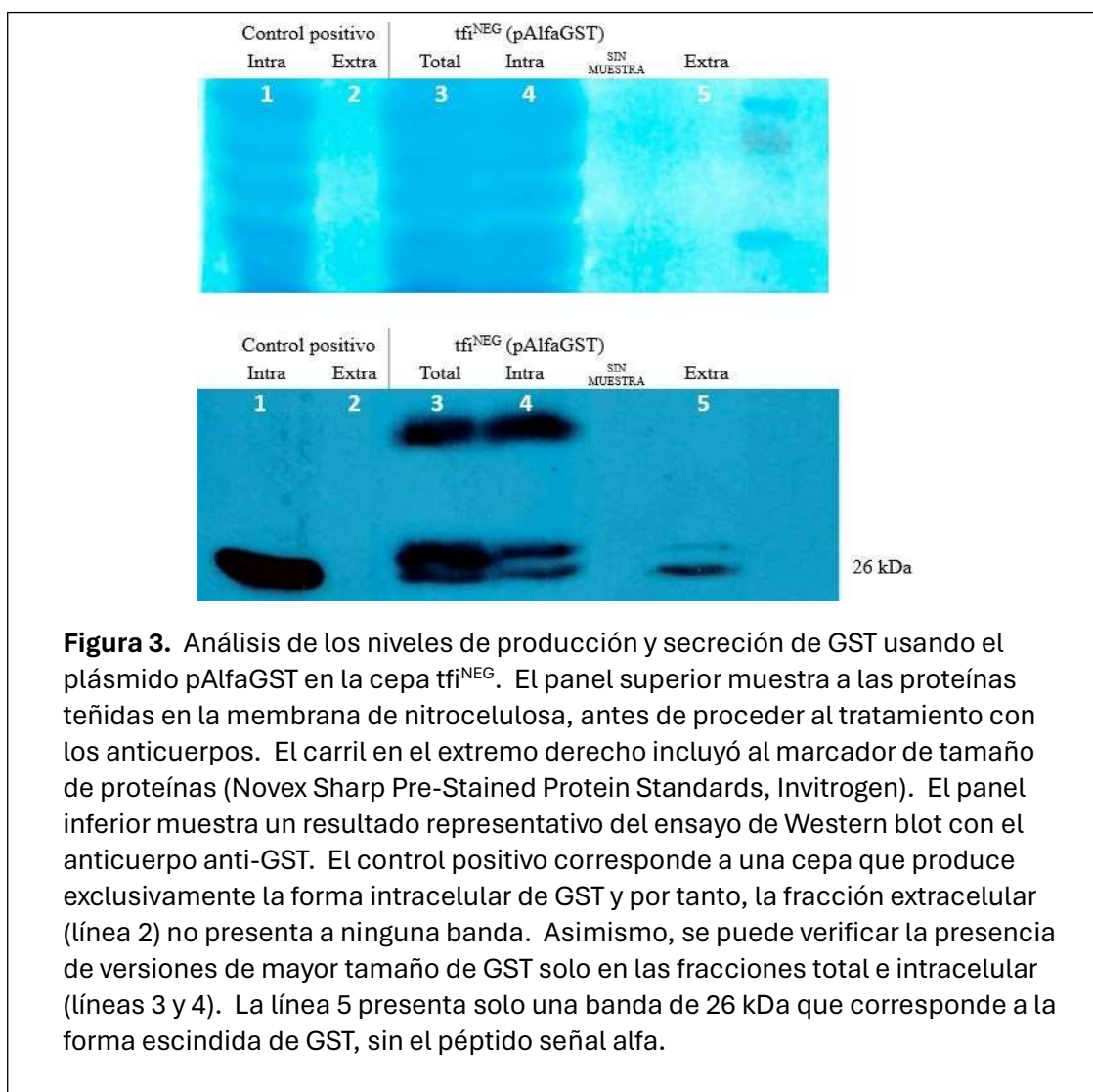


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cepa  $tfl^{NEG}$  fue usada para determinar las respectivas eficiencias de secreción, siendo transformada con los plásmidos pAlfa, pSint, pAlfaGST y pSintGST (tabla 1). Primero, se evaluaron los niveles de expresión y secreción logrados con el plásmido pSintGST, como se observa en la figura 2. De izquierda a derecha, los carriles 1 y 2 contienen las proteínas intracelulares y extracelulares, respectivamente, de un control con confirmada robusta expresión de GST basado en la cepa de genotipo W303<sup>11</sup>. Los carriles 3 y 4 contienen las proteínas totales (intracelulares y extracelulares) y sólo las proteínas intracelulares, respectivamente, del transformante  $tfl^{NEG}$  que incluye el plásmido pSintGST. Se puede observar que el carril 3 muestra ligeramente mayor contenido de GST que el carril 4, como era de esperar ya que incluye la suma de proteínas totales. Finalmente, el carril 5 contiene sólo proteína extracelular.



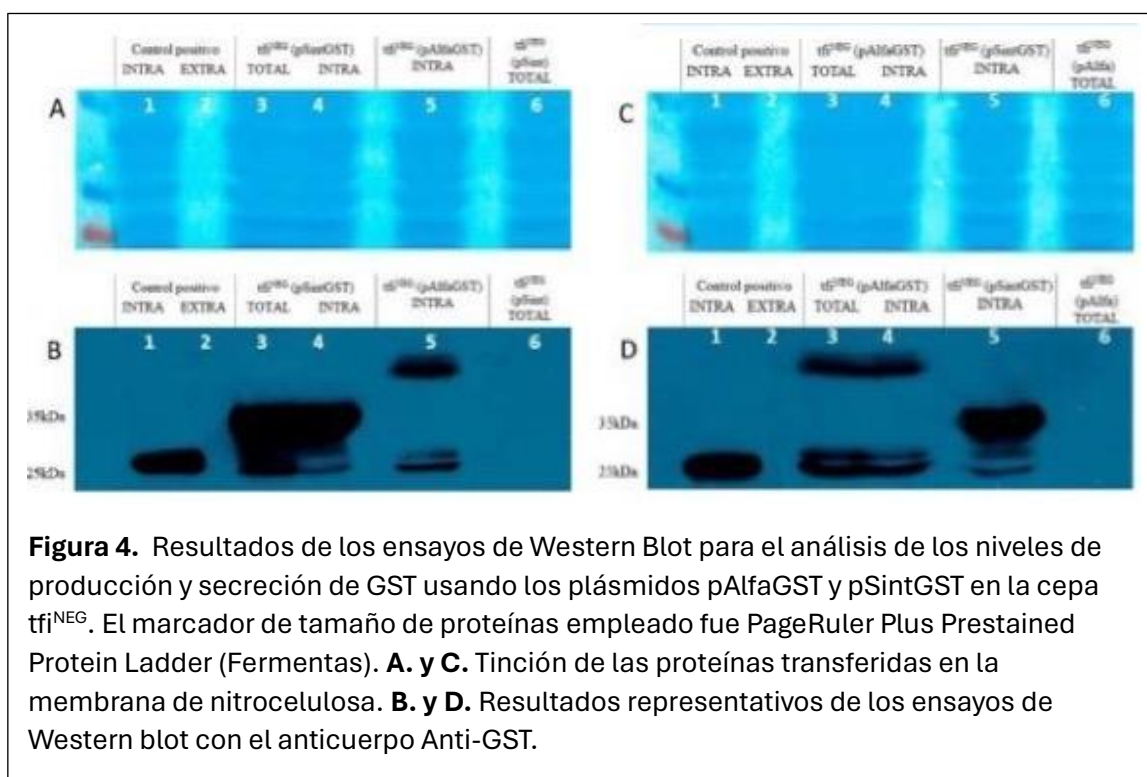
De la misma forma se evaluó la secreción utilizando el plásmido pAlfaGST en  $tff^{NEG}$ . En la figura 3, de izquierda a derecha, los carriles 1 y 2 contienen las proteínas intracelulares y extracelulares del control positivo (W303), respectivamente. La disposición de las muestras y su presentación es similar a la aplicada a los ensayos mostrados en la figura 2. En ambos casos, se pudo demostrar que en las fracciones totales e intracelulares se evidenciaban varias bandas que eran reconocidas por el anticuerpo anti-GST, incluyendo a la del tamaño esperado de 26 kDa. Como era esperado, además, por las características de los péptidos señal, se encontraron bandas de mayor tamaño correspondiente al precursor PS-alfa-GST (figura 3 carriles 3 y 4) que a los encontrados para el precursor PS-sintético-GST (figura 2 carriles 3 y 4). Sin embargo, en ambos casos, la proteína encontrada en la fracción extracelular correspondía casi exclusivamente a la proteína de 26 kDa, con el tamaño esperado después de la escisión del respectivo péptido señal.



Para poder hacer una comparación de los resultados entre los diferentes transformantes, se corrieron las muestras correspondientes a los transformantes que incluyen los plásmidos pAlfaGST, pSintGST y pAlfa/pSint (controles negativos), en un mismo gel. En los paneles A y B de la figura 4, de izquierda a derecha, los carriles 1 y 2 contienen

las proteínas intracelulares y extracelulares del control positivo (W303), respectivamente. Se observa claramente la banda esperada sólo en el carril 1, debido a que, para este control, se espera un contenido netamente intracelular. Los carriles 3 y 4 contienen las proteínas totales (intracelulares y extracelulares) y sólo las proteínas intracelulares, respectivamente, del transformante que incluye el plásmido pSintGST. El carril 5 contiene las proteínas intracelulares del transformante con pAlfaGST, y el carril 6 contiene las proteínas totales del transformante con el plásmido vacío pSint que, como era de esperarse, no evidencia expresión de GST.

En los paneles C y D de la figura 4 de izquierda a derecha, los carriles 1 y 2 contienen las proteínas intracelulares y extracelulares del control positivo (W303), respectivamente. Los carriles 3 y 4 contienen las proteínas totales (intracelulares y extracelulares) y sólo las proteínas intracelulares del transformante con pAlfaGST, respectivamente. El carril 5 contiene las proteínas intracelulares del transformante con pSintGST. Finalmente, el carril 6 contiene las proteínas totales del transformante con pAlfa que no evidencia expresión de GST. Estos resultados confirman los diferentes tamaños de las proteínas de fusión (PS-alfa-GST y PS-sintético-GST), además de la especificidad del anticuerpo anti-GST usado, evidenciado por la ausencia de bandas en los controles.



## CONCLUSIONES

Los ensayos de electroforesis y Western blot realizados demostraron que es posible lograr la secreción de la proteína glutatión S-transferasa (GST) usando tanto el péptido señal derivado del factor de apareamiento alfa (PS-alfa) como el péptido señal denotado como “sintético” (PS-sintético, derivado de las secuencias Yps1/Yap3/TA57). Ambos péptidos señal mostraron similares eficiencias de secreción.

Asimismo, los ensayos mostraron que la presencia de los PS-alfa y PS-sintético generan proteínas precursoras GST de diferentes tamaños durante su tráfico a través de la vía secretora, pero solo la forma procesada del tamaño esperado es la que logra ser secretada.

## AGRADECIMIENTOS

SNMG agradece al Vicerrectorado de Investigación – UNALM por el financiamiento otorgado mediante el “Décimo Concurso de Subvención de Tesis de Pregrado - UNALM 2020”. Las autoras agradecen la generosa provisión del plásmido pJN1 y la cepa de levadura tfi<sup>NEG</sup> al laboratorio del Dr. Jens Nielsen, Universidad Tecnológica de Chalmers, Suecia. Asimismo, el apoyo de los integrantes del Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lee M, Miller E, Goldberg J, Orci L, Schekman R. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:87-123.
2. Feizi A, Österlund T, Petranovic D, Bordel S, Nielsen J. Genome-scale modeling of the protein secretory machinery in yeast. *PloS One.* 2013;8<sup>5</sup>:e63284.
3. Park K, Ju S, Kim N, Park S-Y. The Golgi complex: a hub of the secretory pathway. *BMB reports.* 2021;54<sup>5</sup>:246.
4. Bao J, Huang M, Petranovic D, Nielsen J. Balanced trafficking between the ER and the Golgi apparatus increases protein secretion in yeast. *AMB Express.* 2018;8:1-10.
5. Mori A, Hara S, Sugahara T, Kojima T, Iwasaki Y, Kawarasaki Y *et. al.*, Signal peptide optimization tool for the secretion of recombinant protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 2015;120<sup>5</sup>:518-25.
6. Owji, H., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Hajiebrahimi, A., & Ghasemi, Y. A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *Eur. J. Cell Biol.* 2018;97<sup>6</sup>:422-441.
7. Schäfer F, Seip N, Maertens B, Block H, Kubicek J. Purification of GST-tagged proteins. *Methods in Enzymol.* 2015;559:127-39.
8. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods.* 2006;38<sup>4</sup>:283-93.
9. Mansilla S. Clonación en plásmidos para la producción y secreción de péptidos o proteínas en *Saccharomyces cerevisiae*, [Tesis de pregrado]. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2021.
10. Liu Z, Tyo KE, Martínez JL, Petranovic D, Nielsen J. Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 2012;109<sup>5</sup>:1259-68.

11. Thomas BJ, Rothstein R. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*. 1989;56<sup>4</sup>:619-30.
12. Pierce, B. D., & Wendland, B. Sequence of the yeast protein expression plasmid pEG (KT). *Yeast*. 2009;26<sup>6</sup>:349-353.
13. Lee SJ, Ramesh R, de Boor V, Gebler JM, Silva RC, Sattlegger E. Cost-effective and rapid lysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells for quantitative Western blot analysis of proteins, including phosphorylated eIF2 $\alpha$ . *Yeast*. 2017;34<sup>9</sup>:371-82.
14. Koontz L. TCA precipitation. *Methods in Enzymol*. 541: Elsevier; 2014. p. 3-10.
15. Ruiz L, Vivas-Ruiz D, Lazo F, Seifert W, Rodríguez E, Sandoval G *et. al.*, Purificación y caracterización bioquímica de la enzima similar a trombina del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*. *Rev. Soc. Quim. Perú*. 2017;83<sup>4</sup>:463-74
16. Quispe E, Torrejón D, Bautista L, Sandoval G, Rodríguez E, Lazo F *et. al.*, Purificación y algunas propiedades bioquímicas y moleculares de una nueva fosfolipasa A2 no miotóxica del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Rev. Soc. Quim. Perú*. 2019;85<sup>4</sup>:505-17.

# ¿ES ESTO UN BITTI? EVALUACIÓN QUÍMICA DE LOS PIGMENTOS PRESENTES EN “EL SEÑOR DE LA CAÍDA”

Jhonatan Arízaga Torres<sup>\*a</sup>, Patricia Gonzales Gil<sup>a</sup>, Nancy Junchaya Rojas<sup>b</sup>

## RESUMEN

Bernardo Bitti es una de las figuras más resaltantes en la historia de la pintura virreinal peruana; sin embargo, se cuenta con escasos estudios centrados en la caracterización técnica de su obra. En la iglesia de San Pedro de Lima se encuentran tres lienzos atribuidos a Bitti, además de una tabla policromada titulada “El Señor de la Caída”, que podría pertenecer al mismo autor y que es el objeto de esta investigación. El estudio se centró en el análisis químico de los pigmentos que fueron utilizados en la policromía, mediante espectroscopía de fluorescencia de rayos X portátil, microscopía óptica, microespectroscopía Raman y microscopía electrónica de barrido, con el fin de evaluar si pudiera pertenecer a la época de Bitti. Si bien se detectaron algunos pigmentos modernos, estos parecen provenir de intervenciones posteriores. Los pigmentos identificados como propios de la pintura en el curso de esta investigación fueron blanco de plomo, azurita (en algunos tonos azules), bermellón (rojos y encarnaciones), amarillo de plomo y estaño, y yeso (capa de preparación). Además, sobre la base de los resultados obtenidos se postula el posible uso de ocre y tierras en los tonos marrones, así como de una laca orgánica en los tonos rosa, aunque esto debe ser confirmado mediante análisis adicionales. Dado que todos estos pigmentos concuerdan con la época de Bitti, no se descarta la posibilidad de que la obra sea también de este artista. Con esta investigación se busca contribuir a la difusión de la técnica material empleada en la pintura virreinal peruana, así como a la construcción de una base de datos para los estudios relacionados a Bitti y a otros artistas de la época.

**Palabras clave:** Bitti, pintura virreinal, pigmentos, XRF, Raman, SEM-EDS

## IS THIS A BITTI? A CHEMICAL ASSESSMENT OF THE PIGMENTS PRESENT IN “EL SEÑOR DE LA CAÍDA”

### ABSTRACT

Bernardo Bitti is one of the most important figures in the history of Peruvian viceregal painting. However, there are few studies focused on the technical characterization of his work. In the church of San Pedro de Lima, there are three canvas paintings attributed to Bitti, as well as a panel painting, with the title “El Señor de la Caída”, which could also belong to this author, and which is the object of this investigation. This study was focused on the chemical analysis of the pigments that were used in this painting through portable X-ray fluorescence spectroscopy, optical microscopy, Raman microspectroscopy, and

---

<sup>a</sup> Departamento de Ciencias, Sección Química, Pontificia Universidad Católica del Perú, Av. Universitaria 1801, Lima 15088, Perú, [jjarizagat@pucp.edu.pe](mailto:jjarizagat@pucp.edu.pe)

<sup>b</sup> Conservadora independiente.

scanning electron microscopy to evaluate if it could belong to Bitti's time. Even though some modern pigments were detected, they seem to come from later interventions. The pigments that were identified as belonging to the painting during this investigation were lead white, azurite (in some blue tones), vermilion (reds and flesh tones), lead-tin yellow and gypsum (ground layer). Additionally, based on the obtained results, it is proposed that ochres and earths may have been used in the brown tones and a red lake in the pink ones, but this must be confirmed by further analyses. Since all these pigments are in agreement with what was used in Bitti's time, we cannot rule out the possibility that "El Señor de la Caída" may have also been painted by this artist. With this investigation we seek to contribute to the dissemination of the material technique used in Peruvian viceregal painting, as well as to the construction of a database for studies related to Bitti and other artists of his time.

**Key words:** Bitti, viceregal painting, pigments, XRF, Raman, SEM-EDS

## INTRODUCCIÓN

El análisis científico de obras de arte ha ido recibiendo cada más atención en los últimos años. El estudio técnico de la obra de un pintor permite lograr una mejor comprensión del desarrollo de la pintura en la época en la que el artista la produjo. Adicionalmente, esta información es muy importante para llevar a cabo procesos de restauración con una base científica sólida. Por ejemplo, la detección de zonas que han sido objeto de restauraciones anteriores puede ser crucial al momento de tomar decisiones sobre la remoción de algunas capas de barniz o pintura y, además, la identificación de un pigmento propenso a degradación puede contribuir a tomar las medidas necesarias para evitar un mayor deterioro o alteración<sup>1-3</sup>. Por último, la caracterización química de una obra pictórica puede permitir situarla en el tiempo de acuerdo con los materiales que se identifiquen en ella e, incluso, contribuir a reforzar o refutar una atribución de autoría, si se conoce ya de manera previa la paleta del pintor<sup>4,5</sup>.

La identificación de los materiales utilizados por un artista es una labor bastante complicada. Una pintura constituye una mezcla compleja de compuestos, por lo que es necesario utilizar una serie de técnicas complementarias entre sí para lograr una adecuada caracterización del objeto en estudio<sup>6,7</sup>. Adicionalmente, cuando se trata de un objeto de patrimonio cultural, el acceso a muestras para realizar los análisis suele ser limitado y, en ocasiones, imposible. Esto se debe tanto al alto valor cultural (y económico) de las piezas como a su estado de conservación. Por ello, se debe recurrir a técnicas no destructivas y, cuando es posible, a algunas técnicas de carácter microdestructivo<sup>8</sup>.

Una de las primeras técnicas a las que se recurre en el análisis químico de los pigmentos presentes en una pintura es la espectroscopía de fluorescencia de rayos X (XRF). Esta permite realizar una evaluación preliminar y relativamente rápida de los elementos presentes en un objeto y, además, en su versión portátil, evita tener que trasladar el objeto a un laboratorio para su análisis<sup>9</sup>. Normalmente, los estudios por XRF se complementan luego con una exploración mediante otras técnicas analíticas. Sin embargo, en ocasiones, por las dimensiones de las obras en estudio, su ubicación o la imposibilidad de tomar muestras, los investigadores pueden estar limitados al uso de la XRF. Aunque en estas condiciones, no se obtiene una información completa, se han publicado algunos estudios utilizando la XRF como única técnica para la evaluación química de una pintura<sup>1,10,11</sup>.

Uno de los principales problemas que se enfrenta cuando se realiza el análisis por XRF de una pintura es la estratigrafía de la obra. Esta técnica no permite establecer si las señales obtenidas pertenecen a elementos que se encuentran en la capa superior de la pintura o en una capa más interna. En algunos casos, la atenuación de la radiación por parte de los materiales que se encuentran en las capas externas incluso puede resultar en que no se detecten los elementos de las capas más internas. Adicionalmente, si bien la XRF proporciona información muy valiosa, se trata de una técnica de análisis elemental y no molecular, por lo que no es capaz de informar acerca de los compuestos presentes en la pintura sino solo de los elementos que los componen<sup>12</sup>.

Una técnica que sí permite obtener información que lleve a la identificación de compuestos es la microespectroscopía Raman<sup>13</sup>, la cual ha demostrado ser de gran ayuda en la caracterización de los materiales utilizados en pintura, tanto para los pigmentos inorgánicos como para algunos componentes orgánicos<sup>13, 14</sup>. Esta técnica puede ser utilizada de manera no destructiva (e incluso existe en una versión portátil) y también en forma microdestructiva, para lo cual se toman micromuestras de la obra.

Si bien la microespectroscopía Raman tiene una alta resolución espacial y también provee buena especificidad molecular, muchas veces es difícil obtener señales utilizables cuando las muestras tienen un contenido considerable de materia orgánica<sup>13</sup>. Por ejemplo, la presencia de colorantes orgánicos y de aglutinantes puede resultar en una fluorescencia muy alta que encubre por completo las señales que hubiesen podido llevar a la identificación de los compuestos de interés<sup>13</sup>.

Si se dispone de una micromuestra, se puede llevar a cabo el montaje en una resina, de modo que se acceda a un análisis en sección transversal, tanto por microespectroscopía Raman como por microscopía óptica, y, de esta manera, se pueda obtener información sobre la estratigrafía de la muestra de pintura tomada<sup>14</sup>. Las resinas más utilizadas actualmente para el montaje de las muestras son las de poliéster y las epóxicas, ya que combinan las características deseadas para estos propósitos, como son el color, la rapidez de curado, la temperatura de curado y la eficiencia de encapsulamiento de la muestra<sup>15</sup>.

El análisis estratigráfico puede ser complementado, con la microscopía electrónica de barrido (SEM), la cual permite el estudio de la topografía de la muestra y, si se acopla con un detector de energía dispersiva (SEM-EDS), se puede obtener información acerca de los elementos que constituyen cada capa<sup>5, 14</sup>. Al realizar este tipo de análisis es posible que se presenten efectos de carga por la baja conductividad de la muestra y, sobre todo, de la resina. El recubrimiento de la muestra con un material conductor puede reducir este problema, pero esto no siempre es posible en materiales de patrimonio cultural ya que se debe realizar análisis con múltiples técnicas sobre una sola micromuestra<sup>16</sup>. Por ello, se recurre a mediciones a bajo vacío o al recubrimiento de la resina con pintura de carbón para reducir, en la medida de lo posible, los efectos de carga<sup>16</sup>.

La información química que se puede obtener de una pintura es en extremo valiosa, pero cobra sentido solo cuando se interpreta bajo una mirada interdisciplinaria. El presente trabajo se realizó en el curso de un proyecto destinado al estudio de las obras de Bernardo Bitti que se encuentran en la iglesia de San Pedro de Lima (Cercado de Lima). El objetivo del proyecto era complementar la información que se tiene sobre estas obras sumando la caracterización química a la información estilística e histórica de la que se dispone.

Bernardo Luis Demócrito Bitti (1548-1610), hermano jesuita, llegó a Lima en 1575 y, desde ese momento hasta su muerte, se dedicó íntegramente a crear obras pictóricas y escultóricas para las iglesias de la Compañía de Jesús en el Virreinato del Perú<sup>17, 18</sup>. La importancia de Bitti radica tanto en la gran calidad artística y en la belleza de sus obras,



como en la participación que estas tuvieron para la propagación de la fe católica en América del Sur, lo que se conoce como la evangelización por medio de la imagen<sup>19,20</sup>. En la iglesia de San Pedro de Lima se encuentran tres pinturas de gran formato atribuidas a Bitti: “La Coronación de la Virgen”<sup>21</sup> y “La Candelaria”<sup>19</sup>, de marcada tendencia manierista, y “Nuestra Señora de la O”, obra posterior, que muestra una evolución hacia el naturalismo<sup>18</sup>. Si bien Bitti nunca firmó sus obras, su estilo, con figuras alargadas y estilizadas, de poses sofisticadas y poco naturales, permite a los expertos atribuir potenciales autorías.

La información que se tiene de los materiales empleados por Bitti es muy escasa. Se han realizado algunas investigaciones de los materiales y técnicas empleados en la pintura colonial sudamericana, pero la mayoría se enfoca en las escuelas andinas (Cusco y Bolivia) de los años posteriores a Bitti<sup>22,23</sup>. Los estudios centrados en la época de Bitti han explorado, más bien, la figura de Angelino Medoro<sup>24,25</sup>. En el curso de estos últimos estudios, fue analizada también una obra atribuida a Bitti (un retrato que pertenece a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos), pero no se brindaron detalles acerca de los materiales encontrados en esa pintura<sup>24</sup>. En la Tabla 1, se presenta un resumen de los pigmentos que han sido reportados en pinturas, tanto europeas como sudamericanas, que pertenecen a la época de Bitti, incluyendo la composición química de los mismos.

Tabla 1. Pigmentos utilizados en pintura en Europa y América (siglo XVI)<sup>24, 26</sup>.

Color	Pigmento	Elemento representativo	Composición química
Blanco	Blanco de plomo (albayalde)	Pb	$Pb(CO_3)_2(OH)_2$
Rojo	Rojo de plomo (minio)	Pb	$Pb_3O_4$
	Bermellón	Hg, S	HgS
	Ocre rojo	Fe, Si, Al, K	Arcilla y $Fe_2O_3$
	Laca roja	C	Colorantes obtenidos a partir de cochinilla y rubia
Amarillo	Amarillo de plomo y estaño	Pb, Sn	$Pb_2SnO_4$ (Tipo I) o $Pb(Sn,Si)O_3$ (Tipo II)
	Ocre amarillo	Fe (Si, Al, K)	Arcilla y $FeO(OH)$
	Oropimente	As, S	$As_2S_3$
Verde	Malaquita	Cu	$2CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2$
	Tierra verde	Fe, Mg, Al, Si	Arcilla, $K[(Al,Fe^{3+}), (Fe^{2+},Mg)](AlSi_3, Si_4)O_{10}(OH)_2$
	Verdigris	Cu	$Cu(OH)_2 \cdot (CH_3COO)_2 \cdot 5H_2O$
	Resinato de cobre	Cu	$Cu(C_{19}H_{29}COO)_2$
Azul	Azurita	Cu	$Cu_3(CO_3)_2(OH)_2$
	Esmalte	Co, Si, K	$SiO_2(65\%) + K_2O(15\%) + Al_2O_3(5\%) + CoO(10\%)$
	Vivianita	Fe, P	$(Fe^{2+})_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$
	Índigo	C	Colorante orgánico vegetal, $C_{16}H_{10}N_2O_2$
Negro	Carbón vegetal	C	C y cenizas
	Negro de huesos	Ca, P	$Ca_3(PO_4)_2 + CaCO_3 + C$

Los dos únicos reportes que se han podido hallar en la bibliografía de análisis químico de obras de Bernardo Bitti son aquellos que corresponden a “La oración en el huerto”<sup>27</sup> y a la “Madona del pajarito”<sup>28</sup>. Estos estudios, sin embargo, datan de hace más de 20 años y no fueron realizados con las técnicas analíticas más robustas con las que se cuenta actualmente.

La iglesia de San Pedro de Lima posee una obra cuya autoría está en discusión pero que, por algunos elementos de su composición, podría pertenecer a Bitti. “El Señor de la Caída” (Figura 1), es una pintura sobre tabla (madera, 152,5 x 117 cm) de autor desconocido. No se tiene documentación acerca de su origen ni de las posibles

intervenciones que haya podido sufrir esta obra a lo largo de los años. No todos los personajes de esta obra tienen características similares en cuanto a la técnica empleada, por lo que existe la posibilidad de una intervención con múltiples artistas para la elaboración de este cuadro. El tema iconográfico de la pintura se basa en la obra “Caída en el camino del Calvario” de Rafael Sanzio<sup>29</sup>. Al comparar la composición de ambas obras, se puede observar el recorte de los personajes de la margen izquierda en el cuadro del “Señor de la Caída”, por lo que surge la hipótesis de este haya sido, en realidad, una pintura de mayor formato, que fue cortada en algún momento de su historia.



**Figura 1.** “El Señor de la Caída”. Colección Compañía de Jesús, Comunidad de San Pedro.

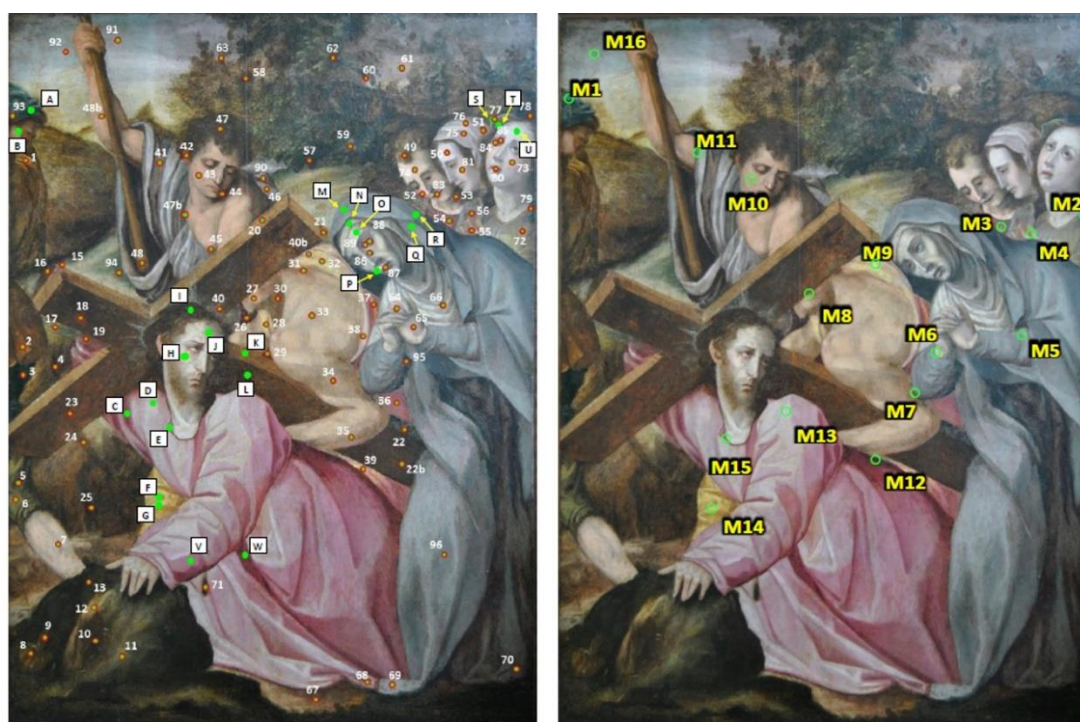
Según Ricardo Estabridis, historiador del arte peruano y estudioso de nuestro arte virreinal, en la Carta Anua de 1589 se menciona que en la iglesia de San Pedro de Lima se hallaba una colección de 26 tablas que representaban los misterios de la vida de Cristo y que rodeaban el interior del templo<sup>20</sup>. Ninguna de estas tablas parece haber llegado a nuestros días. Sin embargo, el historiador resalta la existencia de una tabla (“Cristo camino al Calvario se encuentra con su madre”) que en ese momento se encontraba en proceso de restauración en los talleres de la iglesia, y sugiere que podría tratarse de una de las 26 obras antes mencionadas<sup>20</sup>. “Cristo camino al Calvario se encuentra con su madre” es, justamente, la obra objeto de este estudio y se encuentra actualmente registrada con el título de “El Señor de la Caída”.

En la presente investigación, se llevó a cabo el análisis de los pigmentos utilizados en “El Señor de la Caída”, para evaluar la posibilidad de que esta obra date efectivamente de la época de Bitti y, de ser posible, contribuir a reforzar o refutar la atribución de autoría a este pintor. Con este artículo se busca incrementar el conocimiento que se tiene sobre las obras atribuidas a la época de Bitti, desde el punto de vista químico y contribuir a un flujo de información que es muy necesario para establecer comparaciones entre los artistas de este importante período en la historia de la pintura virreinal.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Análisis por espectroscopía de fluorescencia de rayos X (XRF)

Se utilizó un analizador portátil de fluorescencia de rayos X Bruker Tracer III-SD, sin filtros, y montado sobre un trípode, para el análisis *in situ* de la obra. La pintura estuvo soportada por una pared para el análisis y se comprobó que no hubiese interferencias de dicha superficie). El analizador fue posicionado a una distancia de 1 mm de la zona en estudio. El análisis fue realizado utilizando el software S1PXRF, propio del equipo. El tiempo de análisis fue de 30 segundos, con un voltaje de 40 kV y una corriente de 10,3  $\mu$ A. Los espectros fueron procesados con el software Spectra Artax 7.4.0.0. El análisis se realizó en dos etapas: una etapa inicial de exploración que consistió en el análisis de 23 zonas de la obra (Figura 2, izquierda, A a W) y una evaluación posterior más detallada de 96 zonas adicionales (Figura 2, izquierda 1 a 96).



**Figura 2. Zonas analizadas de “El Señor de la Caída.** Izquierda: analizadas por XRF. Las letras mayúsculas indican los puntos evaluados en la primera etapa de análisis, mientras que los números indican la segunda etapa de análisis. Derecha: zonas de extracción de micromuestras.

### Toma de micromuestras

Partiendo de los resultados de los análisis realizados por XRF, se procedió a la toma de muestras (Figura 2, derecha). Para esto, se utilizó un bisturí de hoja de punta, con el cual se realizó un corte triangular y profundo, procurando tomar todas las capas de pintura en cada muestra.

### Montaje de micromuestras en resina

Las muestras fueron montadas en mini cubos de 1 x 1 x 1 cm con una resina epóxica de dos componentes de la marca Leco. Se dejó curar la resina por lo menos un día, luego de

lo cual se procedió a cortar los cubos de resina con una sierra de joyero hasta el punto donde se encontraba la muestra y a pulir la superficie de corte con paños de pulido grueso y fino (grados 120 a 12000) Micro Mesh para exponer la sección transversal<sup>4,15</sup>.

### **Análisis de micromuestras mediante microscopía óptica**

Se utilizó un microscopio Zeiss Axio Imager.M2m con fuentes de excitación de luz visible, 365 nm, 405 nm y 485 nm. Se tomaron fotografías con objetivos de 5, 10X, 20X, and 50X y un ocular de 10X. Las imágenes fueron tomadas con la cámara digital Zeiss AxioCam HRc digital camera en conjunto con el software Zeiss AxioVision.

### **Análisis de micromuestras mediante microespectroscopía Raman**

Se utilizó un espectroscopio Raman de sobremesa con microscopio confocal Renishaw inVia, con una fuente de excitación de 785 nm. Los espectros se obtuvieron con un tiempo de acumulación de 20 segundos, variando el número de repeticiones y la potencia del láser (esta última, cerca de 0,3 mW para evitar la degradación térmica de las muestras<sup>3</sup>). Los espectros obtenidos fueron procesados con el programa Horiba LabSpec 5 y comparados con los espectros disponibles en dos bases de datos gratuitas en internet: Cultural Heritage Science Open Source (<https://chsopensource.org/download/8102/>) y University College London (<http://www.chem.ucl.ac.uk/resources/raman/>).

### **Análisis de micromuestras mediante SEM-EDS**

Se redujo el grosor de la resina que soportaba a la muestra a 1-2 mm. La resina fue montada en un soporte de aluminio utilizando cinta adhesiva de carbono de doble lado, y luego se recubrió la resina con pintura de carbono, dejando expuesta solo la zona de la muestra. Se realizó el análisis utilizando un SEM Zeiss EVO MA15 con una fuente LaB6 a un voltaje de 20 kV para el haz de electrones. Se ajustó la distancia de trabajo a 11 mm. El análisis de EDS fue realizado con un detector Bruker Nano X-flash® 6 | 30 y el software Quantax 200/Esprit 1.9.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La obra en estudio, “El Señor de la Caída”, fue analizada mediante diversas técnicas microscópicas y espectroscópicas para identificar los pigmentos que la constituyen y, luego, realizar una interpretación de estos resultados en el contexto histórico en el que podría haberse creado esta obra.

La primera técnica que se utilizó fue la XRF ya que, por ser de carácter no destructivo, permite una evaluación general de las diversas zonas de la obra. El análisis de una pintura por XRF puede ser realizado utilizando diversas condiciones de voltaje, corriente y tiempo, con o sin filtros y con o sin aplicación de vacío<sup>12</sup>. En este caso, dado que se estaba realizando un análisis exploratorio, se trabajó sin filtros y con el voltaje máximo que permite el equipo (40 kV). Dadas las dimensiones de la obra, el tiempo de análisis se ajustó a 30 segundos para permitir el estudio de una mayor cantidad de zonas en un tiempo razonable. Un incremento en el tiempo de análisis a 60 segundos no mejoró las señales en una proporción que justificase el tiempo invertido. Si bien la detección de los elementos más ligeros, como el aluminio, el silicio y el fósforo, se hace difícil en estas

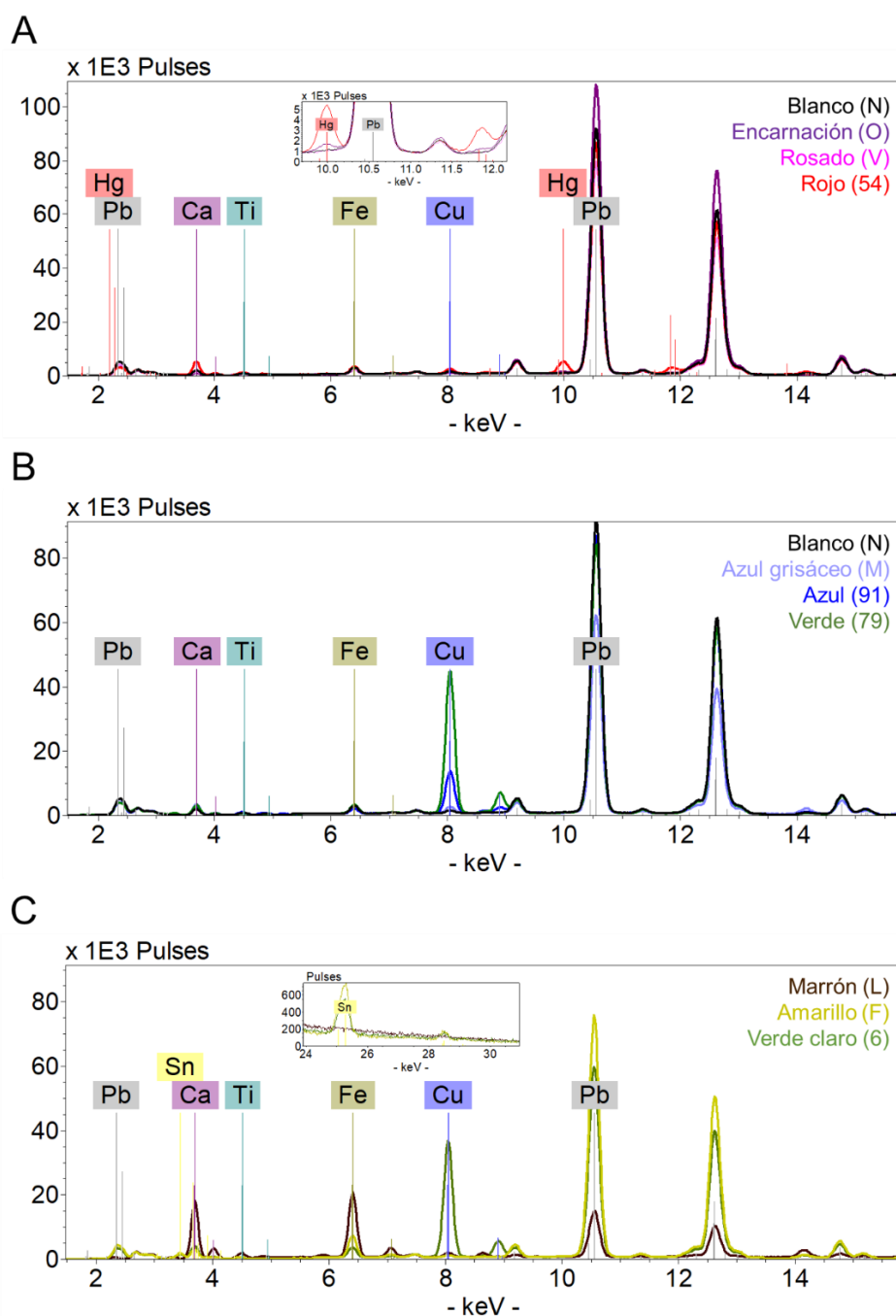
condiciones de trabajo, la ausencia de señales de otros elementos en una zona determinada de la pintura es ya información en sí misma que puede guiar la siguiente etapa de análisis. En algunos casos, el análisis por XRF de las encarnaciones (rostros, manos) mostraron la presencia de bario y titanio (Tabla 2), elementos que no corresponden a ningún pigmento utilizado durante el siglo XVI. Esto sugiere que estas zonas han sufrido repintes, probablemente con blanco de bario (utilizado desde el siglo XIX) y blanco de titanio (disponible desde 1921)<sup>26</sup>. También se detectó cromo, cadmio y selenio en otras zonas de la pintura (Tabla 2). Estos elementos estarían indicando intervenciones posteriores a Bitti, dado que corresponden a pigmentos que se comenzaron a utilizar a partir del siglo XIX<sup>26</sup>. Estos resultados fueron considerados al momento de seleccionar luego las zonas para toma de muestras, de modo que se evitasen áreas con repintes.

Tabla 2. Zonas con potenciales intervenciones posteriores a la época de Bitti.

Zona de análisis	Elementos detectados	Pigmentos propuestos
16	Cd, Se	Rojo de cadmio
17	Cr, Ti	Amarillo de cromo, verde de cromo, verde Viridiana, blanco de titanio
12	Cd	Amarillo de cadmio
27	Ti	Blanco de titanio
34	Ti	Blanco de titanio
35	Ti	Blanco de titanio
36	Ti	Blanco de titanio
45	Cr, Sr	Amarillo de estroncio
46	Ti	Blanco de titanio
47	Cr	Amarillo de cromo, verde de cromo
64	Ti	Blanco de titanio
87	Cr, Ti	Anaranjado de cromo, amarillo de cromo, blanco de titanio
88	Ti, Ba	Blanco de titanio, blanco de bario
93	Cr	Amarillo de cromo, verde de cromo, verde viridiana
94	Cr, Cd	Amarillo de cadmio, verde de cromo
95	Cr, Ti, Ba	verde de cromo, verde viridiana, blanco de titanio, blanco de bario

Si bien se encontraron pigmentos que no corresponden al siglo XVI, estos parecerían ser adiciones y no así los materiales originales de la obra. Las claras señales de plomo obtenidas en la totalidad de la tabla mediante el análisis por XRF (Figura 3) sugieren el uso de blanco de plomo tanto en las zonas blancas como en zonas en las que se habría utilizado para matizar los tonos de otros pigmentos. También fue recurrente la detección de mercurio en las encarnaciones y en algunas zonas de color rojo, lo cual es indicativo del uso de bermellón (Figura 3A). Ambos pigmentos fueron ampliamente utilizados durante la época virreinal.

El análisis por XRF de la túnica de Cristo (de tono rosado) y de la vestimenta rojiza de uno de los tres personajes presentes en la zona superior derecha de la obra mostró una ausencia total de mercurio (Figura 3A). Tampoco se detectó una cantidad apreciable de hierro ni una señal más intensa de plomo que pudiesen apuntar al uso de ocre o de rojo de plomo, respectivamente (Figura 3A). Esto podría indicar el uso de colorantes de naturaleza orgánica en estas zonas, como se discute más adelante. Las zonas verdes y azules mostraron la presencia de cobre, aunque esta señal fue mínima en el manto de Virgen (Figura 3B). Finalmente, en los tonos amarillos se detectó estaño, lo cual sugiere el uso de amarillo de plomo y estaño, y el análisis de las zonas marrones mostró la presencia de hierro, calcio y, en ocasiones, potasio, lo que es indicativo del uso de ocre o tierras (Figura 3C).



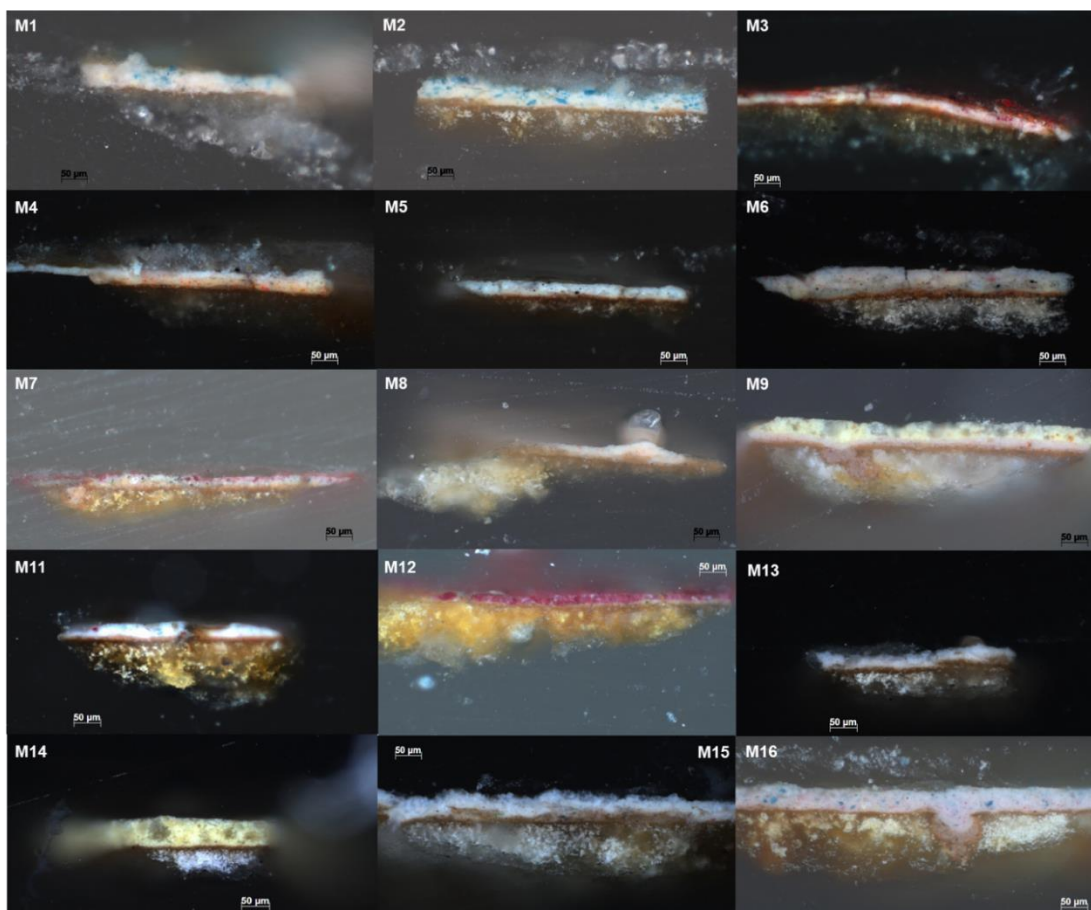
**Figura 3. Espectros de XRF de algunos puntos representativos de la obra. A. Rosados y rojos. B. Azules y verdes. C. Amarillos, verdes y marrones. La codificación de los puntos de análisis corresponde a la que se muestra en la Figura 2. En A y B se ha incluido una zona de color blanco como referencia.**

Luego de este primer análisis por XRF, se procedió a tomar micromuestras de las 16 zonas indicadas en la Figura 2 (derecha). Estas fueron evaluadas mediante microscopía óptica, microespectroscopía Raman y, tres de ellas, por SEM-EDS.

El análisis de la estratigrafía de las muestras obtenidas de la obra evidencia una ejecución relativamente sencilla por parte del artista (Figura 4). En la mayoría de las muestras (ver como referencia la muestra M2 en la Figura 4) se observó una base de preparación, seguida por una delgada capa de imprimación de unos 10 a 15  $\mu\text{m}$  y, luego, una sola capa de pintura. En cuatro muestras (Figura 4, M3, M4, M7 y M9) se observó esta misma

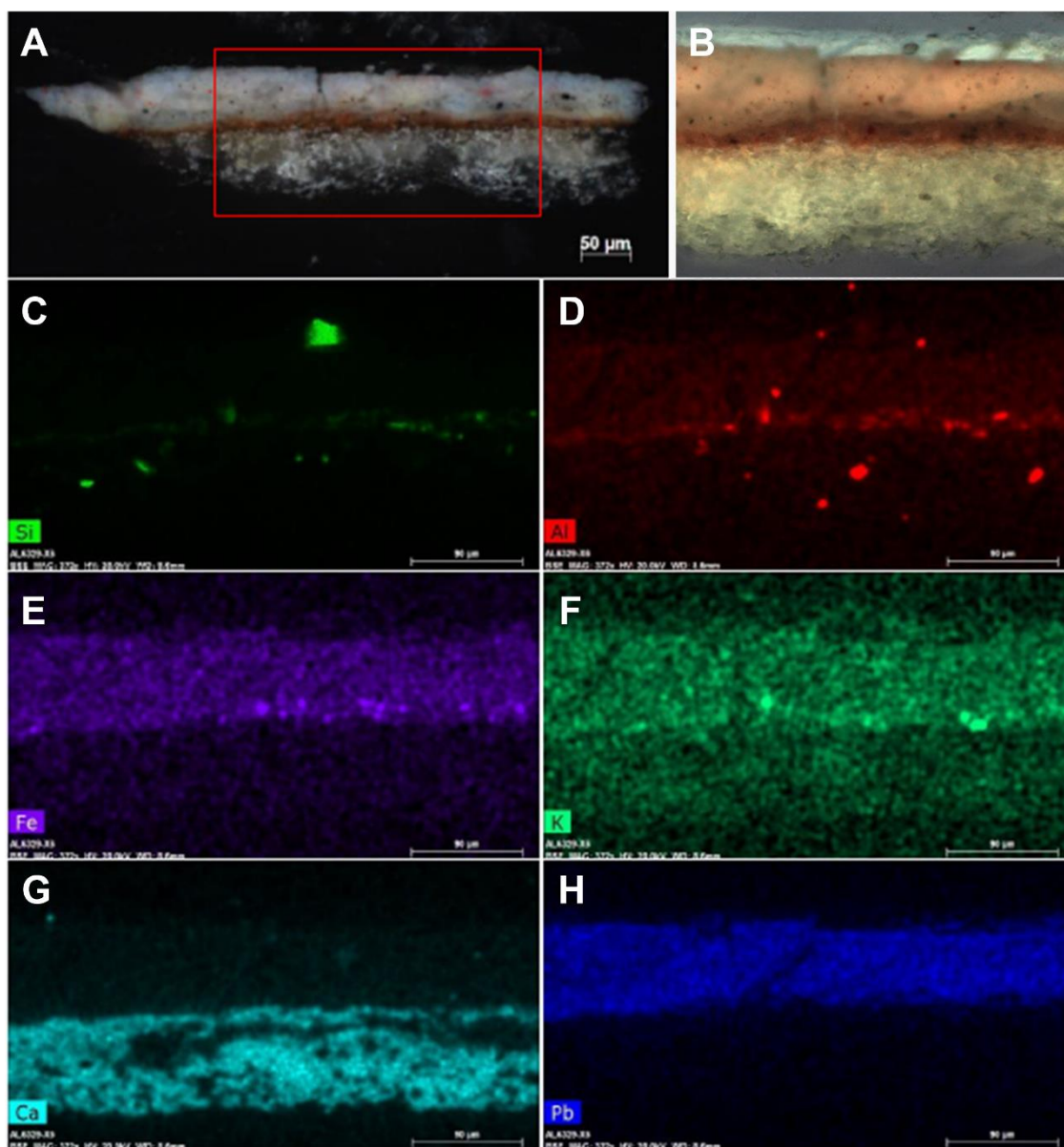


composición, pero con dos capas pictóricas. La capa de imprimación es semi translúcida y de color pardo, tal como se puede apreciar para todas las muestras en la Figura 4. Esto se ha observado en obras anteriores a la época de Bitti, por ejemplo, en la obra de Tiziano y en el famoso altar de Ghent<sup>30, 31</sup>.



**Figura 4: Análisis por microscopía óptica de las muestras extraídas de “El Señor de la Caída”.** Las muestras fueron montadas en resina y se observan en sección transversal bajo luz visible y un aumento de 200X. La escala que se observa es de 50 µm. Se ha omitido la muestra M10 ya que la fotografía era menos clara, por el tamaño y forma de la muestra.

Para evaluar con más detalle la composición de la capa de imprimación, se procedió a realizar un análisis por SEM-EDS de tres muestras. En la Figura 5, se presentan los resultados del análisis de la muestra M6 por microscopía óptica y por SEM-EDS. Se puede ver claramente la capa de imprimación tanto bajo luz visible (5A) como bajo luz ultravioleta (5B) y, por las características observadas por microscopía óptica, probablemente se trate de una capa oleosa. El color podría deberse al uso de tierras o arcillas, como sugiere la presencia de silicio, aluminio, hierro y potasio detectada por SEM-EDS (Figura 5C, 5D, 5E, 5F, respectivamente).



**Figura 5: Análisis por microscopía óptica y mapeo elemental por SEM-EDS de la muestra M6. A:** Microfotografía de la muestra bajo luz visible, como referencia. **B:** Detalle de la sección transversal de la muestra vista bajo luz UV (405 nm). **C-H:** Mapeo elemental de la zona señalada en A con un rectángulo rojo (se muestra la ubicación del elemento indicado en cada sub-imagen).

La predominancia de calcio en la capa de preparación (Figura 5G) apunta al uso de yeso en la misma. El análisis de la capa pictórica mostró claramente el uso de un pigmento de plomo (Figura 5H), tal como lo sugería el análisis por XRF. La evaluación de las 16 muestras por microespectroscopía Raman permitió confirmar la presencia de yeso y de blanco de plomo en la capa de preparación y en la capa pictórica, respectivamente, en todas ellas (Tabla 3).

En la Tabla 3, se muestra un resumen de los resultados obtenidos en las 16 muestras por microespectroscopía Raman. Este análisis permitió confirmar la presencia bermellón en las encarnaciones y en algunas zonas rojas, así como de amarillo de plomo y estaño en las zonas amarillas.



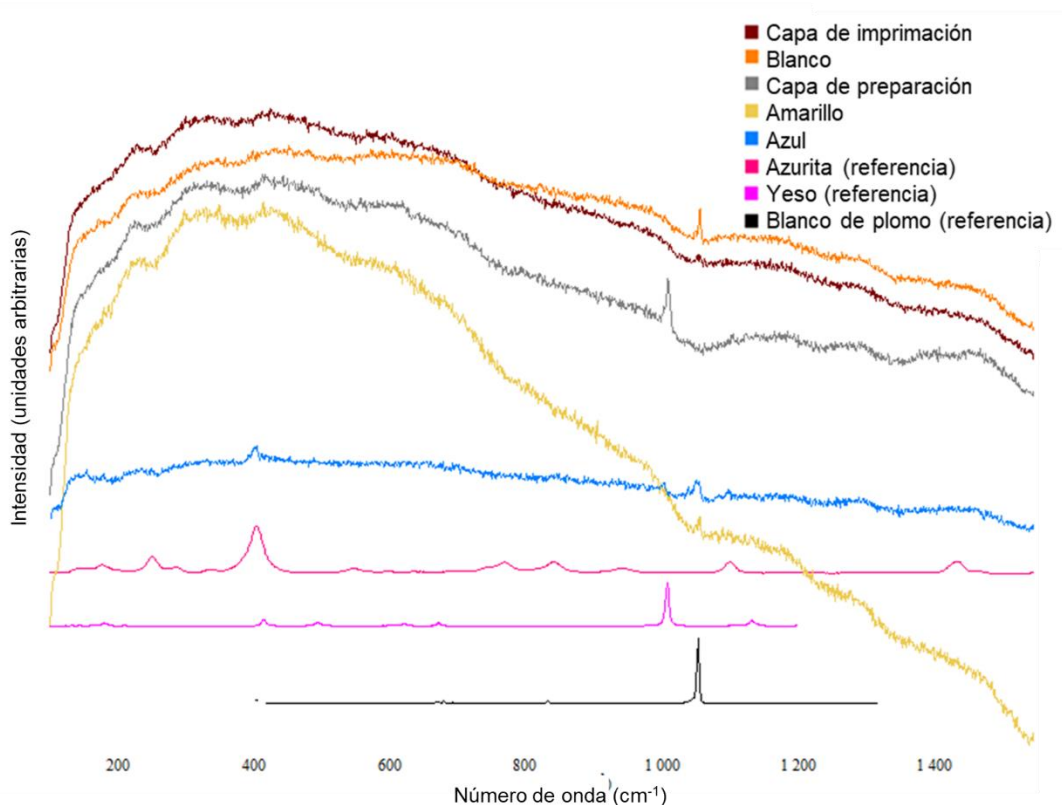
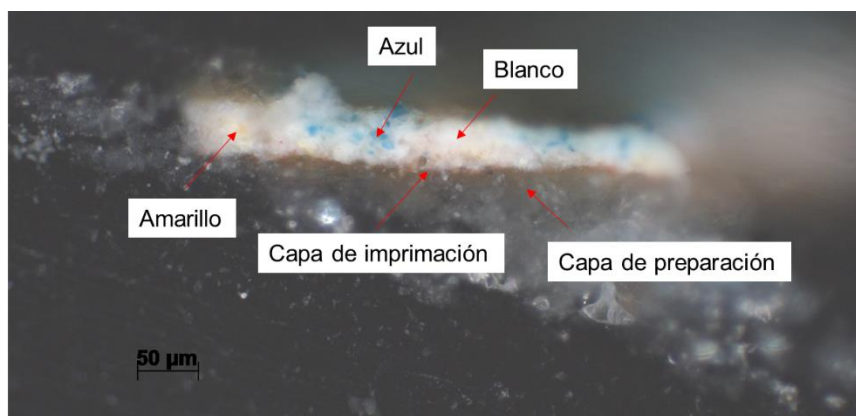
Tabla 3. Pigmentos encontrados en el análisis por microespectroscopía Raman de las muestras tomadas “El Señor de la Caída”.

Muestra	Color	Capa de preparación	Capa pictórica			
		Yeso	Blanco de plomo	Amarillo de plomo y estaño	Bermellón	Azurita
M1	Verde	X	X			X
M2	Verde	X	X			X
M3	Rojo	X	X		X	
M4	Rosado	X	X	X	X	
M5	Azul/gris	X	X			
M6	Encarnación	X	X	X	X	
M7	Marrón rojizo	X	X			
M8	Encarnación	X	X		X	
M9	Amarillo	X	X	X	X	
M10	Encarnación	X	X		X	
M11	Verde/Azul	X	X			X
M12	Rosado	X	X			
M13	Rosado pálido	X	X			
M14	Amarillo	X	X	X		
M15	Encarnación	X	X		X	
M16	Azul	X	X			X

Con esta técnica no se pudieron identificar algunos pigmentos de color rosado/rojizo, como aquellos utilizados para la túnica de Cristo y la vestimenta de otros personajes. La ausencia de señales características de los pigmentos rojos de origen mineral en el análisis por XRF, mencionado anteriormente, y la alta fluorescencia y ausencia de señales definidas en el análisis por microespectroscopía Raman en las muestras tomadas de estas zonas apoya la idea del uso de lacas orgánicas para lograr los tonos observados. Un análisis preliminar por espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-MS) de la muestra M12<sup>32</sup> (resultados no mostrados en este manuscrito) sugeriría que se trata de una laca de origen animal (cochinilla o kermes), pero esto debe ser estudiado con más detalle para poder dar una identificación más sólida.

Si bien el color azul del cielo pudo ser atribuido a la presencia de azurita, no fue posible determinar el pigmento utilizado en el manto de Virgen (muestra M5), el cual había dado señales muy bajas de cobre en el análisis preliminar por XRF. Esto podría deberse a que el pigmento esté en menor proporción y a que no logró tomarse una muestra que lo contuviese en cantidades suficientes para permitir el análisis, pero no se puede descartar que se haya utilizado algún otro pigmento más difícil de detectar por estas técnicas, sobre todo cuando se encuentran en baja concentración, como son el índigo o la lazulita. Si bien este último pigmento no ha sido reportado en pinturas al óleo en la época virreinal, sí hay indicios de su uso, muy posiblemente en forma de mineral no refinado, en pintura de paredes de edificaciones virreinales<sup>24</sup>. Se descartó la posibilidad de que se tratase de esmalte dado que no se detectaron señales de cobalto en el análisis por XRF.

Un detalle interesante es la ausencia de pigmentos verdes en las muestras que parecían tener un color verdoso. Al parecer, el color se debe a una capa oscurecida de barniz aplicada sobre una capa pictórica de color azul. La muestra M1 es justamente uno de estos casos y en ella se ha identificado claramente el uso de blanco de plomo y azurita en la capa pictórica (Figura 6). También se pudieron observar algunas partículas de color amarillo claro, pero estas no pudieron ser identificadas.



**Figura 6: Análisis por microespectroscopía Raman de la muestra M1.** En la fotografía se muestran los cinco puntos analizados y se incluyen los espectros obtenidos para estos cinco puntos, así como los espectros de referencia de blanco de plomo, azurita y yeso. Láser de excitación: 785 nm.

## CONCLUSIONES

Mediante el análisis no destructivo y microdestructivo de la obra “El Señor de la Caída”, utilizando técnicas microscópicas y espectroscópicas, se ha podido identificar una buena parte de los pigmentos encontrados en esta pintura. En líneas generales, se ha observado el uso extensivo de blanco de plomo, azurita, bermellón y amarillo de plomo y estaño en las capas pictóricas y de yeso en la capa de preparación. Se propone, además, el potencial uso de tierras u ocre en los tonos marrones y de una laca orgánica en los tonos rosados, aunque esto debe confirmarse mediante otros métodos. Además, se observó el uso de una

delgada capa de imprimación de color pardo, práctica que se ha reportado en otras pinturas sobre tabla tanto anteriores a Bitti como de la época de este artista. Con excepción de las zonas que parecen haber sufrido intervenciones posteriores, los materiales encontrados en la obra son consistentes con aquellos que se reportan para otras obras del siglo XVI, por lo que no se descarta la posibilidad de que “El Señor de la Caída” pertenezca a este período. Por supuesto, no se puede afirmar solo a partir de este estudio que esta obra sea parte de la serie de 26 tablas mencionadas por Estabridis<sup>20</sup>. Se hace necesario investigar otras obras de Bitti a nivel químico para poder establecer comparaciones que permitan ahondar nuestro conocimiento acerca de este artista y determinar si es posible encontrar características técnicas y de uso de materiales que lo diferencien de sus contemporáneos. Existen cerca de 60 obras atribuidas a Bitti que han llegado hasta nuestros días y que se ubican principalmente en diversas ciudades de Perú y Bolivia, y una en Argentina<sup>18</sup>. Los autores se encuentran en el proceso de análisis de tres obras atribuidas con mayor seguridad a Bitti, de acuerdo con criterios estilísticos e históricos, y que forman parte del patrimonio de la iglesia de San Pedro de Lima. Sin embargo, para el caso específico discutido en este artículo, resultaría particularmente interesante contar con acceso al análisis estratigráfico de la “Madona del Pajarito” (el reporte publicado por Querejazu<sup>28</sup> es descriptivo, pero no presenta imágenes de las muestras tomadas durante la intervención). Esta obra es también de una pintura sobre tabla y constituiría una referencia más cercana para comparar “El Señor de la Caída” que los lienzos de Bitti que se encuentran actualmente en estudio en la iglesia de San Pedro de Lima. Dado el número de obras atribuidas a Bitti y su localización, un estudio de su trabajo involucra necesariamente una colaboración e intercambio de información entre diversos investigadores. Con el presente artículo, los autores buscan justamente contribuir a difundir esta información y a hacer que las investigaciones realizadas en torno a este artista sean más visibles en nuestro medio.

## AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo de la Dirección de Gestión de la Investigación y la Sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú (proyecto DGI-2015-1-0015/211). Se agradece al Laboratorio de Investigación Científica y Análisis (SRAL) del Museo Winterthur (Delaware, EE.UU.) por permitir el uso de su instrumentación y al Padre Enrique Rodríguez, S. J., entonces párroco de la iglesia San Pedro de Lima, por permitir el acceso a la obra en estudio y por su apoyo a la investigación científica en el patrimonio de la iglesia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Calza C, Pereira MO, Pedreira A, Tadeu Lopes R. Characterization of Brazilian artists' palette from the XIX century using EDXRF portable system. *Appl Radiat Isotopes*. 2010; 68: 866-870. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2009.10.049>
2. Izzo FC, Zendri E, Balliana E, Falchi L, Piccolo M, Fuso S, van Keulen H. The materials and painting techniques of Giulio Aristide Sartorio in the pictorial cycle “The poem of human life” (1906-07): Knowledge and prevention for a museum

- display project. *Conservation Science in Cultural Heritage*. 2013; 13: 379-393. <https://doi.org/10.6092/issn.1973-9494/4192>
3. Christiansen MB, Baadsgaard E, Sanyova J y Pilkjær Simonsen K. The artists' materials of P. S. Krøyer: An analytical study of the artist's paintings and tube colours by Raman, SEM-EDS and HPLC. *Herit Sci* 2017; 5, 39. <https://doi.org/10.1186/s40494-017-0153-2>
  4. Haddad A, Rogge CE, Martins A, Dijkema D. "Foundations of a great metaphysical style": unraveling Giorgio de Chirico's early palette. *Herit Sci*. 2022; 10:70. <https://doi.org/10.1186/s40494-022-00685-7>
  5. Burgio L, Clark RJH, Sheldon L y Smith GD. Pigment Identification by Spectroscopic Means: Evidence Consistent with the Attribution of the Painting Young Woman Seated at a Virginal to Vermeer. *Anal. Chem*. 2005; 77: 1261-1267. <https://doi.org/10.1021/ac048481i>
  6. Burgio L, Clark RJH y Hark RR. Raman microscopy and x-ray fluorescence analysis of pigments on medieval and Renaissance Italian manuscript cuttings. *PNAS*. 2010; 107: 5726-5731. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914797107>
  7. Berrie BH. Rethinking the history of artist's pigments through chemical analysis. *The Annu Rev Anal Chem*. 2012; 5: 441-459. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062011-143039>
  8. Rebollo E, Nodaria L, Russo U, Bertoncetto R, Scardellato C, Romano F, Ratti F, Poletto L. Non-invasive multitechnique methodology applied to the study of two 14<sup>th</sup> century canvases by Lorenzo Veneziano. *J Cult Herit*. 2013; 14S, e153-e160. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2012.10.020>
  9. Glinsman, L.D. The application of X-ray fluorescence spectrometry to the study of museum objects. Tesis [doctoral]. Países Bajos: Universidad de Amsterdam; 2004.
  10. Uffelman ES, Court E, Marciari J, Miller A y Cox L. Capítulo 3: Handheld XRF analyses of two Veronese Paintings. En Lang PL, Armitage RA, editores. *Collaborative Endeavors in the Chemical Analysis of Art and Cultural Heritage Materials*. ACS Symposium Series. Washington, DC: American Chemical Society; 2012. p. 51-73. <https://doi.org/10.1021/bk-2012-1103.ch003>
  11. Molari R y Appoloni CR. Pigment analysis in four paintings by Vincent van Gogh by portable X-ray fluorescence (pXRF). *Radiat Phys Chem*. 2021; 181, 109336. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.109336>
  12. McGlinchey, C. Capítulo 4: Handheld XRF for the examination of paintings: proper use and limitations. En Shugar, AN y Mass, JL, editores. *Handheld XRF for Art and Archaeology*. Leuven University Press; 2012. p. 131-159. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/j.ctt9qdzfs>.
  13. Casadio F, Daher, C, Bellot-Gurlet L. Raman Spectroscopy of cultural heritage Materials: Overview of Applications and New Frontiers in Instrumentation, Sampling Modalities, and Data Processing. *Top Curr Chem*. 2016, 374:62. <https://doi.org/10.1007/s41061-016-0061-z>
  14. Arslanoglu J, Centeno SA, Digney-Peer S y Duvernois I. Picasso in the Metropolitan Museum of Art: An investigation of materials and techniques. *J. Am. Inst. Conserv*. 2013; 52<sup>3</sup>: 140-155. <https://doi.org/10.1179/1945233013Y.0000000007>
  15. Narayan K. Preparation of cross-sections from easel paintings. *Studies in Conservation*. 2003; 48: sup1, 52-64. <https://doi.org/10.1179/sic.2003.48.Supplement-1.52>

16. Jaques VAJ, Zikmundová E, Holas J, Zikmund T, Kaiser J, y Holcová K. Conductive cross-section preparation of non-conductive painting micro-samples for SEM analysis. *Sci Rep.* 2022; 12, 19650. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21882-1>
17. De Mesa, J. y Gisbert, T. El Hermano Bernardo Bitti-Escultor. En *Actas de las II Jornadas de Andalucía y América*. Sevilla. Escuela de Estudios Hispano-Americanos de Sevilla; 1982. Volumen II, p. 411-42.  
Disponible en <https://dspace.unia.es/handle/10334/338>
18. Amerio E. Demócrito “Bernardo” Bitti, SJ. Un pintor de las Marcas hacia el Nuevo Mundo. *Sílex* 2018; 8<sup>2</sup>: 17-42.
19. Estabridis Cárdenas R. Influencia Italiana en la Pintura Virreinal. En *Pintura en el Virreinato del Perú*. Lima. Banco de Crédito; 1989. p. 109-164.
20. Estabridis Cárdenas R. La obra de Bernardo Bitti en San Pedro de Lima. En *Redescubramos Lima: Iglesia de San Pedro*. Lima: Banco de Crédito; 1996. p. 18-23.
21. Solórzano Gonzales M. La Coronación de la Virgen por la Santísima Trinidad de Bernardo Bitti en el arte peruano virreinal. Tesis [Maestría en Historia]. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2012. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12404/1590>
22. Seldes AM, Burucúa JE, Siracusano G, Maier MS y Abad GE. Green, yellow and red pigments in South American painting (1610-1780). *J. Am. Inst. Conserv.* 2002; 41: 225-242. <https://doi.org/10.1179/019713602806082548>
23. Siracusano G. El poder de los colores. Buenos Aires: Fondo de Cultura Económica de Argentina; 2005.
24. Bruquetas R. Técnicas y materiales en la pintura limeña de la primera mitad del siglo XVII: Angelino Medoro y su entorno. *Goya*. 2009; 327: 144-161.
25. Bruquetas R, Carrassón A, Kuon R, Fiorentino C, Gómez M, Estabridis R. Materials and techniques in viceregal paintings and sculpture in Lima – 16th and 17th centuries. 16th Triennial Conference of the International Council of Museums-Committee for Conservation (ICOM-CC); 19-23 de setiembre de 2011, Portugal. Lisboa: ICOM Committee for Conservation; 2011. P 1-8. Disponible en: <https://www.icom-cc-publications-online.org/1267/Materials-and-techniques-of-the-Vice--royal-Paintings-and-Sculptures-in-Lima-XVI-and-XVII-centuries>
26. Pigments through the ages [en línea]. Douma M (curador). 2008. [accesado 15 de agosto de 2023].  
Disponible en: <http://www.webexhibits.org/pigments/intro/history.html>
27. Stastny F, Rosario Chirinos N. Perfil tecnológico de las escuelas de pintura Limeña y Cuzqueña. *Íconos*. 2000; 4<sup>2</sup>, 19-29.
28. Querejazu P. La Madona del Pajarito. *Conserva*. 2001; 5: 81-94. Disponible en: <https://www.cncr.gob.cl/publicaciones/la-madona-del-pajarito-de-bernardo-bitti-tratamiento-de-conservacion-y-restauracion>
29. Caída en el camino del Calvario [en línea]. Museo del Prado. 2015. [accesado 30 de agosto de 2023] Disponible en: <https://www.museodelprado.es/coleccion/obra-de-arte/caida-en-el-camino-del-calvario/870c8293-1691-4a90-88ff-b554a2bc3fe8>
30. Dunkerton J y Spring M, con contribuciones de Billinge R, Kalinina K, Morrison R, Macaro G, Peggie D y Roy A. “Titian’s Painting Technique to c.1540”. *National Gallery Technical Bulletin*. 2013; 34: 4–31.  
Disponible en: <http://www.nationalgallery.org.uk/technical-bulletin/vol-34-essay-1-2013>

31. Sanyova J, Van der Snickt G y Mederos-Henry F. The Challenges of a Complex Stratigraphy from a Chemical Point of View. En *The Ghent Altarpiece Research and Conservation of the Interior: The Lower Register*. Steyaert G, Postec M, Sanyova J y Dubois H (editors). Bélgica: Brepols; 2021. p. 111-145.
32. Arízaga Torres JJ. Análisis químico de una obra de arte colonial en el Perú del siglo XVI con posible atribución a Bernardo Bitti. Tesis [Licenciatura en Química]. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2018. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12404/12426>

