

ISSN 1810-634X

# REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 82 N° 2  
ABRIL - JUNIO 2016



INSTITUCIÓN CIENTÍFICA FUNDADA EN 1933

LIMA, PERÚ



**REVISTA**  
**de la**  
**SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**  
**(Rev Soc Quím Perú)**  
**ISSN 1810 - 634X**  
**Revista Trimestral**

**Comité Editor**

**Presidenta** : Ana María Muñoz Jáuregui  
**Editor en Jefe** : Ana Cecilia Valderrama Negrón  
**Miembros** : Julio Santiago Contreras  
Karin María Paúcar Cuba  
Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

**Comité Consultivo**

Caramantin, María	<b>Univ. Nac. de Ingeniería, Perú</b>
<b>Universidad de Talca, Chile</b>	Picasso, Gino
Dávalos Prado, Juan	<b>Univ. Nac. de Ingeniería, Perú</b>
<b>Consejo Superior de Investigaciones</b>	Rueda Sánchez, Juan Carlos
<b>Científicas de España</b>	<b>Pontificia Universidad Católica del Perú</b>
Calvo Buendía, Eduardo	Rabinovich Jaitin, Daniel
<b>Univ. Nac. Mayor de San Marcos – Perú</b>	<b>University of North Carolina – USA</b>
Guija Poma, Emilio	María del Rosario Sun Kou
<b>Universidad Científica del Sur – Perú</b>	<b>Dpto. Ciencias, Sec. Química PUCP</b>
Muñoz Jáuregui, Ana	Gutiérrez Correa, Marcel
<b>Universidad San Ignacio de Loyola</b>	<b>Univ. Nac. Agraria La Molina – Perú</b>
Lock Sing, Olga	La Rosa-Toro Gómez, Adolfo
<b>Pontificia Universidad Católica del Perú</b>	<b>Univ. Nac. de Ingeniería, Perú</b>
Santiago Contreras, Julio	Alarcón Caverro, Hugo Arturo
<b>Univ. Nac. Mayor de San Marcos – Perú</b>	<b>Univ. Nac. de Ingeniería - Perú</b>
Valderrama Negrón, Ana	Maza Mejía, Ily
<b>Univ. Nac. de Ingeniería, Perú</b>	<b>Univ. Nac. de Ingeniería, Perú</b>
De La Cruz Azabache, Mario	Gamboia Fuentes, Nadia
	<b>Pontificia Universidad Católica del Perú</b>

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

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

Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú

Teléfono (511) 472-3925

e-mail: [sqperu@gmail.com](mailto:sqperu@gmail.com)

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

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

**Certificado N° 95-1567**

---

**Vol 82**

**ABRIL - JUNIO 2016**

**N°2**

En el Perú: N° suelto S/. 15

Suscripción anual: S/. 60.00

En el extranjero: Suscripción anual: \$50.00



**CONTENIDO**  
**(Vol. 82 – N° 2 – 2016)**

<b>Editorial</b> .....	103
<b>Trabajos Originales</b>	
- Microextracción en fase sólida (SMPE) de compuestos volátiles del género <i>Origanum</i> , por Nils Huamán Castilla, Erik Allcca Alca, Gregorio Arroyo, José Quintana.	105
- Estudio computacional de la reactividad comparada de los aniones tioacetato y tiobenzoato frente al bis-(2,4-dinitrofenil)-éter y al bis-(2,4-dinitrofenil)-sulfuro, por Jorge Cappetta, César Alfonso Micheli.	114
- Influencia del nivel de fermentación del vino base sobre algunos compuestos volátiles del pisco peruano de uva Italia, por Yasser Hidalgo, Beatriz Hatta, Juan Carlos Palma.	128
- Purificación y caracterización de una hemorragina de alto peso molecular presente en el veneno de la serpiente <i>Bothrops pictus</i> , por Candy Bellido, Fanny Lazo, César Ortiz, Edith Rodríguez, Armando Yarlequé.	142
- Elaboración y optimización de una red de sensores electroquímicos para una lengua electrónica orientada al análisis de leche, por Álvaro Á. Arrieta, Jorge A. Díaz, Oscar C. Fuentes.	152
- Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de residuos de barrido de calles usando compost, por Lizardo Visitación Figueroa, Freddy J. Rojas, Víctor Meza Contreras, Lisveth Flores del Pino.	162
- Síntesis de posibles agonistas nicotínicos con potencial actividad insecticida, por Luis J. Reyes-García, Pía Cid.	175
- Aprovechamiento de pelos de vacuno del proceso de pelambre enzimático de las curtiembres en la remoción de plomo, por Carmen Carola Palomino Amorín, Rocío Vargas Parker, Lizardo Visitación Figueroa.	183
- Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación simultánea de Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida, Cafeína y Clorfeniramina maleato en tabletas, por Jhonnell Samaniego Joaquín, Gladys Arias Arroyo.	196
- Elaboración, caracterización electroquímica y estudio motriz de un actuador tricapa, por Saúl Bertel Hoyos, Jairo Segura Bermúdez, Álvaro Arrieta, Yamid Núñez.	208
- Funcionalización de textiles de algodón con nanopartículas de ZnO <sub>2</sub> , por L. Esmeralda Román Mendoza, Carmen Uribe Valenzuela, Dora Maurtua Torres, Elsa Roca Meneses, Marco Brañez Sánchez, Jessica Álvarez Alayo, José L. Solís Veliz y Mónica M. Gómez León.	216
- Desarrollo de los índices de susceptibilidad electrofílica y nucleofílica, por Said Figueredo López, Manuel Páez Meza, Francisco Torres Hoyos.	232
- Interacciones del ácido DL-2-aminobutírico en soluciones acuosas de nitrato de sodio a varias temperaturas, por Manuel S. Paéz M., Dairo E. Pérez S., Oscar Julio M	246
<b>Informaciones</b>	255

**Revista Arbitrada**

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

## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

If the authors reside abroad US \$ 110,00

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

## Formato para los artículos

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

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





## Editorial

Los derivados de petróleo son la principal fuente energética del sector automotriz. Hasta el momento no hay otro combustible que supere a la gasolina en costo y performance. Sin embargo, las reservas de petróleo se están agotando, lo que encarecerá suficientemente este combustible como para que otras alternativas se vuelvan competitivas.

El biodiesel es un combustible alternativo, obtenido por transesterificación de aceites vegetales y grasas. El proceso se realiza utilizando metanol como solvente y un catalizador, de tal manera que se obtiene el éster metílico de los ácidos grasos presentes, liberándose glicerol como subproducto. A diferencia de los aceites vegetales, la mezcla de ésteres metílicos de los ácidos grasos, obtenido durante el proceso de transesterificación, reúne las condiciones técnicas necesarias para ser utilizado como combustible de motores de automóviles sin ninguna modificación.

Otros beneficios de utilizar el biodiesel, al igual que otro biocombustible, son la reducción de gases de efecto invernadero, disminución de la contaminación del aire, combustible biodegradable, renovable y sostenible. Además, la producción de biodiesel tiene un impacto social considerable.

La tecnología para la obtención de biodiesel ha sido desarrollada desde hace 80 años, sin embargo la investigación en este tema es intensa para solucionar los problemas tecnológicos que se presentan.

Los catalizadores en la reacción de transesterificación son muy variados. Pueden ser ácidos, bases o enzimas, siendo el método más utilizado la catálisis básica. Este proceso varía dependiendo de la materia prima utilizada. Si se utiliza aceite vegetal utilizado en frituras, por ejemplo, se tiene que controlar la cantidad de catalizador para generar la menor cantidad posible de espuma. En este caso, la utilización de enzimas no produce espuma pero en cambio la reacción es muy lenta. El uso de catalizadores ácidos es una alternativa, pero necesita temperaturas altas y mayor tiempo de reacción.

Un aspecto importante en la producción de biodiesel es el aspecto de su purificación, especialmente la separación del catalizador. Este proceso puede ser tedioso, consumir tiempo e incrementar los costos de producción. Por dicha razón se han ensayado diferentes catalizadores heterogéneos, encontrándose que los catalizadores heterogéneos básicos son más activos que los ácidos. En la misma línea, se han ensayado enzimas soportadas para facilitar su recuperación y poder reutilizarla en otro proceso.

La primera planta de producción de biodiesel fue puesta en operación en 1985 en Austria. Luego se implementarían diversas plantas de producción de biodiesel en varios países, especialmente en Europa y Estados Unidos. En todas estas plantas se utiliza el proceso de transesterificación de aceites vegetales. Sin embargo actualmente se está ensayando diferentes materias primas. Se está logrando interesantes avances en la producción de biodiesel a partir de residuos de la industria maderera.

De otro lado, el volumen del subproducto de la reacción de transesterificación (glicerol) es tan grande que no ha podido ser utilizado completamente en otras cadenas de producción. Una línea de investigación es la acetilación del glicerol (mono, di o triacetilglicerol) para obtener aditivos de combustible que permitan modular la viscosidad o como anticongelante.

Julio César Santiago Contreras  
Editor

## MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SMPE) DE COMPUESTOS VOLÁTILES DEL GÉNERO *Origanum*

Nils Huamán Castilla<sup>a</sup>, Erik Allcca<sup>a</sup>, Gregorio Arroyo<sup>a</sup>, José Quintana<sup>a</sup>

### RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por finalidad identificar los compuestos volátiles del género *Origanum*. Para tal fin se recolectó 50 muestras de las localidades de Porobaya, San June, Otorá, Doce quebradas y Tala; pertenecientes al distrito de Torata-Moquegua; las muestras recolectadas fueron caracterizadas taxonómicamente encontrándose tres especies *Origanum majoricum* (forma compacta y laxa), *Origanum majorana* y *Origanum plegatifolium*. Posteriormente, se analizó los compuestos volátiles mediante microextracción en fase sólida (SMPE) y GC-MS. Se identificaron 31 compuestos por comparación con la literatura, co-elución con estándares y comparación de índices de retención, encontrándose que el contenido de timol y carvacrol varían de 7 a 14 mg/g y de 37 a 49 mg/g, respectivamente. Las muestras de Porobaya y San June presentaron la mayor cantidad de timol; mientras que Otorá presentó el mayor contenido de carvacrol. Por lo cual la SMPE resulta ser un método rápido y sencillo para identificar volátiles en plantas aromáticas.

**Palabras clave:** *Origanum*, compuestos volátiles, timol, carvacrol.

## SOLID PHASE MICROEXTRACTION (SMPE) VOLATILE COMPOUNDS OF GENUS *Origanum*

### ABSTRACT

This research aims to identify the volatile compounds of genus *Origanum*. For this purpose 50 samples was collected locations: Porobaya, San June, Otorá, Doce Quebradas and Tala; belonging at district of Torata-Moquegua; Samples collected were characterized taxonomically finding four species *Origanum majoricum* (compact and loosely), *Origanum majorana* and *Origanum plegatifolium*. Subsequently the volatiles were analyzed by solid phase microextraction (SMPE) and GC-MS. 31 compounds were identified by comparison with literature, co-elution with standard and comparing retention indices, finding that the content of thymol and carvacrol range from 7 to 14 mg/g and 37 to 49 mg/g respectively. Porobaya samples and San June are increasing the amount of thymol present; Otorá samples

---

<sup>a</sup> Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional de Moquegua, Av. Ancash s/n, Moquegua, Perú,  
e-mail: nilefox@gmail.com; Teléfono: +51-988538896

being more carvacrol content. Therefore the SMPE turns out to be a quick and easy method for identifying volatile aromatic plants.

**Key words:** *Origanum*, compounds volatile, timol, carvacrol.

## INTRODUCCIÓN

El género *Origanum* (familia Lamiaceae, subfamilia Nepetoideae, tribu Mentheae) es originario de las regiones templadas de Europa y Asia, se encuentra distribuido en los 5 continentes<sup>1</sup>. Perteneció a la familia de las Lamiaceas, introducido en Perú desde tiempos remotos, donde se viene cultivando en forma extensiva. Maximixe, empresa consultora de investigación de mercado, demostró que el orégano puede ser diez veces más rentable que otros productos tradicionales, por lo que es una alternativa para las zonas alto andinas más pobres de la región de Moquegua<sup>2</sup>.

La ventaja competitiva de la región Moquegua, se debe a las buenas condiciones edafoclimáticas; sin embargo, uno de los grandes problemas que ha restringido la comercialización del “orégano” ha sido la calidad del producto, ya que se ha encontrado una elevada heterogeneidad del cultivo producido en una misma o en diferentes zonas y altitudes, restringiendo la comercialización en el mercado internacional; otro problema es debido al desconocimiento de las especies de “orégano” cultivadas en la región; así como un inadecuado manejo del cultivo, que disminuye la calidad y precio del mismo y más aún si el mercado internacional desea un orégano con valores altos de timol y carvacrol. Diversos estudios se centran en el aceite esencial del género *Origanum* y diferencian hasta de 10 fenotipos químicos distintos basándose en sus componentes mayoritarios<sup>3</sup>. Este aceite varía mucho dependiendo de la zona, el clima y la temporada de colecta<sup>4</sup>. Bisht y colaboradores<sup>5</sup> encuentran dos grupos que se diferencian porque uno tiene un alto contenido de timol/carvacrol y sus precursores biosintéticos, mientras que el otro tiene un mayor contenido de sesquiterpenos y linalool. La microextracción en fase sólida (SPME) es usada para la caracterización de volátiles en plantas aromáticas; sin generar cambios térmicos como ocurre en la hidrodestilación, permitiendo observar cambios estacionales, especialmente en la variación de la relación timol/carvacrol, según la temporada<sup>6</sup>.

No existen muchos reportes acerca del proceso de secado y su efecto sobre la composición de monoterpenos en orégano. Tampoco existen artículos que relacionen la distribución geográfica, altura y ambiente con la composición obtenida final. El análisis por SPME provee una herramienta importante para analizar la composición sin intervención y alteración térmica por la generación del aceite esencial por hidrodestilación. El objetivo del presente estudio es caracterizar taxonómicamente e identificar los monoterpenos y sesquiterpenos (compuestos volátiles) mediante la microextracción en fase sólida (SMP) en las especies del género *Origanum*.

## PARTE EXPERIMENTAL

Se recolectó 50 muestras de orégano en estado de floración (100 g c/u) de las localidades de: San June (2973,1 msnm), Otorá (2600,3 msnm), Porobaya (2763,8 msnm), Tala (3403,8 msnm) y Doce Quebradas (2173,7 msnm); pertenecientes al distrito de Torata - Moquegua, las cuales fueron transportadas en papel microperforado y colocadas bajo sombra para su posterior análisis mediante SPME.

**Caracterización taxonómica:** para identificar las especies del género *Origanum* se siguió la metodología propuesta por Berlyn y Miksche<sup>7</sup>; se realizó secciones transversales, longitudinales y paradermales de los órganos en estudio, cortadas a mano alzada; se analizó fragmentos del tallo a partir de 10 cm del ápice caulinar, de la porción inferior del limbo foliar, incluida la nervadura central y del pecíolo proximal y distal de hojas adultas.

**Análisis de las muestras del género *Origanum* por SPME (micro-extracción en fase sólida) y GC-MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas):** Para la sorción de los compuestos volátiles se utilizó una fibra SPME triple de CARBOXEN/DVB/PDMS (Sigma Aldrich) con espesor de 50/30µm, la cual permite la captura de un mayor rango de compuestos volátiles. Antes de cada análisis, las fibras fueron activadas a 260°C durante 30 minutos, siguiendo las instrucciones del fabricante, para eliminar cualquier compuesto que se haya quedado adherido a la fibra. Se pesó 6 g de material y se les colocó en una recámara de vidrio con 3 entradas con septos de teflón para colocar los SPMEs y con un volumen de 500 mL (figura 1). Se dejó equilibrar a 40°C en una estufa durante una hora para saturar la recámara de volátiles y alcanzar un equilibrio entre las muestras y la atmósfera. Al cabo de este tiempo se expuso las fibras a la recámara durante quince minutos para capturar los compuestos volátiles. El análisis se hizo directamente en material seco sin moler; y la fibra captura los compuestos volatilizados en el espacio de cabeza de la recámara.



**Figura 1.** Sistema SMPE, para el análisis de compuestos volátiles.

Una vez finalizada la captura de compuestos volátiles, se colocó la fibra en el inyector del cromatógrafo de gases a 260 °C durante cinco minutos para desorber (retirarlo de la superficie de la fibra) los volátiles que se encontraban adheridos a la fibra y se analizaron los compuestos capturados por GC-MS utilizando el siguiente método: a) Programa de temperatura del horno: 40 °C durante 2 minutos. De 40 – 150 °C a 5 °C/min, de 150 a 170 °C a 10 °C/min, de 170 -250 °C a 30 °C/min y a 250 °C por 2 minutos. b) Flujo: 0,9 ml/min, c) Temperatura del inyector: 260 °C d) Modo de división de flujo: Splitless (sin división), e) Se utilizó una columna HP-5ms ((5%-fenil)-metilpolisiloxano), 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de fase estacionaria, f) Equipo y detector: Cromatógrafo Agilent 7890B con inyector Multimodo (MMI) y detector selectivo de masas de cuadrupolo, Agilent 5977C con ionización por electrones a 70eV.

Para la identificación de los compuestos volátiles se utilizó base de datos de espectros de masa NIST (2011), estándares del laboratorio y la comparación de índices de retención lineal. La pureza fue evaluada adicionalmente usando el software de deconvolución de espectros de masas AMDIS versión 2.68. La cuantificación de áreas bajo los picos del cromatograma se realizó con la ayuda del programa ChemStation versión F.01.00.1903 de Agilent. Para cada compuesto obtenido se calculó el índice de retención experimental a partir de una muestra de estándares de calibración de alcanos lineales (C8 a C20 – Sigma-Aldrich). Asimismo, para verificar la identidad de los compuestos, se comparó los tiempos de retención y los perfiles de fragmentación con los estándares respectivos. Los perfiles de cada muestra de orégano fueron comparados utilizando el programa DataAnalysis versión 4.0 (Bruker).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización taxonómica se detalla en la tabla 1, al respecto los datos aportados por Ayqui-Vilca<sup>8</sup> y Fátima Cáceres<sup>9</sup>, de *Origanum majoricum*, *Origanum majoricum* forma compacta y *Origanum majoricum* forma laxa y *O. plegatifolium*, coinciden con la descripción del presente estudio. Si se consideran los caracteres exomorfológicos (tipo de brácteas, cáliz y corola y pilosidad foliar) y anatómicos de los ejemplares de referencia, se puede establecer que existen tres especies como es el caso de: *Origanum majoricum* forma compacta y *Origanum majoricum* forma laxa, *Origanum majorana* y *Origanum plegatifolium*.

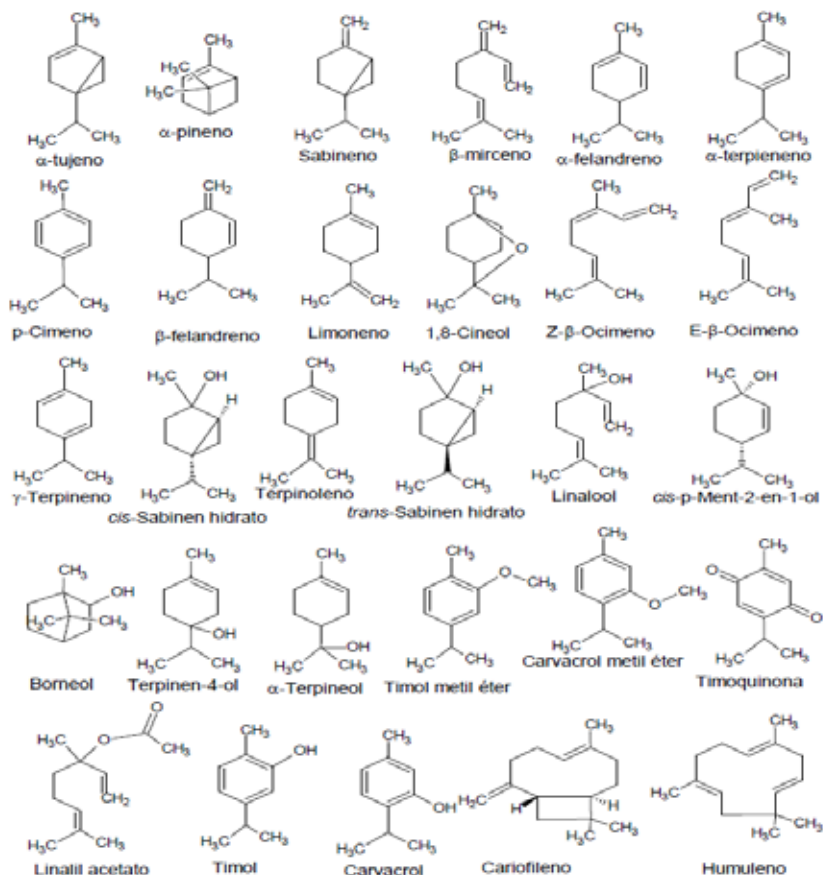
Con el fin de estudiar la distribución del aceite esencial en las diversas muestras de las especies del género *Origanum*, es deseable analizar las glándulas de aceite individuales en cada hoja de orégano<sup>10</sup>. Esta tarea es posible mediante la extracción del aceite de las glándulas con una fase sólida de micro-extracción (SPME) de fibra, junto con un sistema GC-MS. Esto permitirá tener un muestreo rápido y eficiente de la extracción de los analitos adheridos en la fibra (SMPE), la cual representa la misma cantidad que una gota de aceite esencial según el espacio de cabeza y la temperatura del medio<sup>11</sup>. Para evitar distorsiones de cuantificación debido a la saturación del espacio de cabeza, se realizaron experimentos preliminares para optimizar la concentración de la muestra. Se encontró que, si se ha utilizado 50 g de muestra, el contenido carvacrol y timol es sub representado por esta cantidad de muestra diferenciando la materia seca y el contenido de humedad (figura 1).

Dentro de los 32 monoterpenos y sesquiterpenos (compuestos volátiles) identificados en el presente trabajo (figura 2), los más importantes son el timol y carvacrol; estos dos compuestos son responsables del aroma característico de las especies del género *Origanum*. Diversas investigaciones mencionan que la presencia y alta concentración de timol en aceite esencial del género *Origanum*; se debe a la actividad de la enzima terpeno-sintetasa que regula la conversión de terpineno a timol<sup>12</sup>. Lukas *et al.*<sup>13</sup> a partir de aceite esencial obtenido por hidrodestilación; identificaron además de timol y carvacrol otros 21 monoterpenos y sesquiterpenos en *Origanum vulgare* L. Es importante resaltar que la composición de los compuestos volátiles es extremadamente variable entre especies de este género; por lo general estas diferencias se encuentran en la distribución y composición de sus monoterpenos. Asimismo, la microextracción en fase sólida captura de manera adecuada la fracción más ligera de monoterpenos y sesquiterpenos, representando mejor la composición de aceite esencial; evitando cambios estructurales debido a rearrreglos u oxidación en las moléculas de monoterpenos; como comúnmente sucede en la hidrodestilación<sup>14</sup>.

**Tabla 1.** Caracterización taxonómica de las especies del género *Origanum*.

Nº	Código	Descripción taxonómica	Nº	CÓDIGO	descripción taxonómica
1	T-01	<i>Origanum majoricum forma laxa</i>	26	SJ-10	<i>Origanum majorana</i> L.
2	T-02	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>	27	SJ-11	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
3	T-03	<i>Origanum majorana</i>	28	SJ-12	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
4	T-04	<i>Origanum majorana</i>	29	SJ-13	<i>Origanum plegatifolium</i>
5	T-05	<i>Origanum majorana</i>	30	SJ-14	<i>Origanum plegatifolium</i>
6	T-06	<i>Origanum majorana</i>	31	SJ-15	<i>Origanum majorana</i> L.
7	T-07	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>	32	SJ-16	<i>Origanum majorana</i> L.
8	T-09	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>	33	SJ-17	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
9	T-10	<i>Origanum majoricum forma laxa</i>	34	SJ-18	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
10	T-11	<i>Origanum majorana</i>	35	SJ-19	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
11	T-12	<i>Origanum majorana</i>	36	SJ-20	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
12	DC-1	<i>Origanum majorana</i>	37	SJ-21	<i>Origanum majoricum forma laxa</i>
13	DC-2	<i>Origanum majorana</i>	38	SJ-22	<i>Origanum majoricum forma laxa</i>
14	DC-3	<i>Origanum majorana</i>	39	SJ-23	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
15	DC-4	<i>Origanum majorana</i>	40	SJ-24	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
16	DC-5	<i>Origanum majorana</i>	41	SJ-25	<i>Origanum majorana</i> L.
17	SJ-01	<i>Origanum majorana</i> L.	42	SJ-26	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
18	SJ-02	<i>Origanum majorana</i> L.	43	OT-01	<i>Origanum majoricum forma laxa</i>
19	SJ-03	<i>Origanum majorana</i> L.	44	OT-02	<i>Origanum majoricum forma laxa</i>
20	SJ-04	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>	45	OT-03	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
21	SJ-05	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>	46	PO-01 <sup>a</sup>	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
22	SJ-06	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>	47	PO-02 <sup>a</sup>	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
23	SJ-07	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>	48	PO-02B	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
24	SJ-08	<i>Origanum majorana</i> L.	49	PO-03 <sup>a</sup>	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>
25	SJ-09	<i>Origanum majorana</i> L.	50	PO-03C	<i>Origanum majoricum forma compacta</i>

T: Tala; DC: Doce quebradas; SJ: San June; OT: Otorá; PO: Porobaya



**Figura 2.** Estructuras de los monoterpenos y algunos sesquiterpenos encontrados en las especies del género *Origanum*

La tabla 2 muestra los promedios más altos de monoterpenos y sesquiterpenos de las tres especies encontradas en el género *Origanum*; se puede observar que las concentraciones más importantes pertenecen a linalool + trans sabinen hidrato, seguido de  $\gamma$ -terpineno, p-cimeno,  $\alpha$ -terpineno, limoneno, terpinen-4-ol, timol y carvacrol; es notable también la cantidad de cis-sabinen hidrato y sabineno que existen en las especies estudiadas. Asimismo, las muestras de San June y Porobaya presentan contenidos altos de timol, a diferencia de Otor que presentan el contenido más alto de carvacrol; solo el código SJ8 presentó contenidos similares de timol y carvacrol. Los resultados obtenidos en comparación con otros estudios presentan valores relativamente altos en el contenido de timol y carvacrol<sup>12, 14, 15</sup>. Al respecto, se sabe que las especies del género *Origanum* contienen una mayor proporción de carvacrol y timol en el verano que en el otoño; es decir, si se cosecha en verano los días son largos y habrá mayor exposición a la radiación solar, a diferencia del otoño los días cortos y tienen una menor exposición a la radiación solar<sup>15</sup>. Las muestras fueron recolectadas en el mes



de enero (verano) periodo de floración, esto explica la variación encontrada. El análisis de varianza realizado a los factores en estudio tales como distribución geográfica y tipo de especie, muestran un p-valor de 0,042 y 0,038 respectivamente ( $\alpha < 0,05$ ), entonces podemos concluir que existe suficiente evidencia estadística con un 95% de confiabilidad para aceptar que dichos factores influyen sobre el contenido de monoterpenos y sesquiterpenos de las especies del género *Origanum*.

**Tabla 2.** Contenido de monoterpenos y sesquiterpenos en especies del género *Origanum*

Descripción	<i>O. majorana</i>	<i>O. plegatifolium</i>	<i>O. majoricum</i>	
			forma laxa	forma compacta
<i><math>\alpha</math>-thujene</i>	7,3079	17,5177	13,5151	10,2135
<i><math>\alpha</math>-pinene</i>	1,8085	2,5165	1,5711	1,6978
<i>Sabinene</i>	14,4719	30,8062	22,5566	22,6833
<i>l-octen-3-ol</i>	2,7447	5,1555	----	----
<i><math>\beta</math>-myrcene</i>	12,2187	28,1613	13,0152	9,87456
<i><math>\alpha</math>-phellandrene</i>	5,0112	33,9326	27,3161	21452
<i><math>\alpha</math>-terpinene</i>	30,3898	38,4517	20,6882	20,8149
<i>p-cymene</i>	31,5344	92,4885	61,7596	61,8863
<i>Limonene</i>	21,0219	72,3406	56,3281	56,4548
<i>(Z)-<math>\beta</math>-ocimene</i>	17,606	14,5917	5,639	5,7657
<i>(E)-<math>\beta</math>-ocimene</i>	5,5923	8,1212	2,722	2,8487
<i>g-terpinene</i>	67,7364	72,9458	23,6764	23,8031
<i>cis-sabinene hydrate</i>	20,3883	21,4205	11,441	11,5677
<i>Terpinolene</i>	11,9988	52,9171	32,5682	32,6949
<i>trans-sabinene hydrate</i>	-----	10,969	52,8264	52,9531
<i>Linalool</i>	27,3598	18,4651	8,1506	8,2773
<i>cis-p-menthen-2-en-1-ol</i>	6,3823	22,7786	10,3957	10,5224
<i>trans-p-menthen-2-en-1-ol</i>	3,0571	16,2468	5,3694	5,4961
<i>terpinen-4-ol</i>	53,7126	48,147	70,3251	70,4518
<i><math>\alpha</math>-terpineol</i>	24,519	55,4875	15,7101	15,8368
<i>thymol methyl ether</i>	24,0342	46,2043	15,3088	15,4355
<i>carvacrol methyl ether</i>	45,1914	86,257	22,7326	22,8593
<i>Thymoquinone</i>	6,9976	2,5254	0,9198	1,0465
<i>Linalyl acetate</i>	7,8921	82,849	27,0293	27,156
<b>Thymol</b>	<b>7,7252</b>	<b>11,053</b>	<b>15,5045</b>	<b>14,857</b>
<b>Carvacrol</b>	<b>37,6106</b>	<b>49,0984</b>	<b>39,0564</b>	<b>37,0564</b>
<i>Caryophyllene</i>	37,9032	67,8147	25,4174	25,5441
<i>Aromadendrene</i>	6,2333	9,4568	2,5593	2,686
<i>Humulene</i>	5,8054	11,744	3,0114	3,1381
<i>Alloaromadendrene</i>	----	1,5654	0,4866	0,6133
<i><math>\alpha</math>-muroloeno</i>	31,8592	20,211	4,1324	4,2591
<i><math>\beta</math>-bisabolene</i>	0,8389	2,91	0,5622	0,6889

La composición de monoterpenos y sesquiterpenos está expresado en mg/g m.s (materia seca)

## CONCLUSIONES

Se identificaron las especies de *Origanum majuricum* (forma laxa y forma compacta), *Origanum plegatifolium* y *Origanum majorana*; el análisis por microextracción en fase sólida permitió identificar 32 monoterpenos y sesquiterpenos; por comparación con una base de datos, co-elución con estándares y comparación de índices de retención; asimismo, el contenido de timol varía de 7 a 14 mg/g y el contenido de carvacrol varía de 37 a 49 mg/g; las muestras que mayor cantidad de timol presentan pertenecen a las localidades de San June y Porobaya, mientras que el mayor contenido de carvacrol pertenecen a la localidad de Otora. El tipo de especie y la distribución geográfica influyen sobre el contenido de estos compuestos.

## AGRADECIMIENTO

Se agradece a la Universidad Nacional de Moquegua - Perú, por financiar el presente proyecto de investigación. Al Dr. Eric Cossio, Docente Principal del departamento de Ciencias – sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Banchio E, Bogino P, Zygodlo J, Giordano W. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochem Syst Ecol.* 2008; 36: 766–771.
2. Castillo A. Propagación de plantas por cultivo in vitro. *Revista de investigación Agraria.* 2004; 12 (1):382-392.
3. Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry.* 2001; 57 (1): 65-72.
4. Alves-Pereira I y Fernandes-Ferreira M. Essential oils and hydrocarbons from leaves and calli of *Origanum vulgare* ssp. *Virens* *Phytochemistry.* 1998; 48 (5): 795-801.
5. Bisht D, Chanotiya Ch, Rana M, Semwal M. Variability in essential oil and bioactive chiral monoterpenoid compositions of Indian oregano (*Origanum vulgare* L.) populations from northwestern Himalaya and their chemotaxonomy. *Ind Crops Prod.* 2009; 30 (3): 422-432.
6. Yousif A, Durance T, Scaman C, Girard B. Flavor volatiles and physical properties of vacuum-microwave- and air-dried sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Int J Food Sci.* 2000; 65 (5): 926 - 932.
7. Berlin G, Miksche P. Botanical microtechnique and cytochemistry. 3rd edition. Iowa: Iowa State University Press; 1976.
8. Ayqui-Vilca S. Comportamiento Agronómico de Orégano Negro, Mejorana, Zambito, Chinito en la Región de Arequipa. *Natural Sciencie.* 2010; 2 (1): 57-62.

9. Cáceres de Baldárrago F. Identificación y Caracterización Botánica de especies del género *Origanum* L. cultivados en la Región de Arequipa. *Natural Sciencie*. 2009; 3 (1): 36-42
10. Johnson Ch, Kazantzis A, Skoula M, Mitteregger U, Novak. Seasonal, populational and ontogenic variation in the volatile oil content and composition of individuals of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, assessed by GC headspace analysis and by SPME sampling of individual oil glands. *Phytochem Anal*. 2004; 15 (5): 286 - 292.
11. Grassi P, Novak J, Steinlesberger H, Franz Ch. A direct liquid, non-equilibrium solid-phase micro-extraction application for analysing chemical variation of single peltate trichomes on leaves of *Salvia officinali*. *Phytochem Anal*. 2004; 15 (3): 198 - 203.
12. Crocoll Ch, Asbach J, Novak J, Gershenzon J. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Mol Biol*. 2010; 73(6):587–603.
13. Lukas B, Schmiderer C, Novak J. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochemistry*. 2015; 119 (1): 32–40
14. Gong HY, Liu WH, Lv G.Y, Zhou X. Analysis of essential oils of *Origanum vulgare* from six production areas of China and Pakistan. *Rev Bras Farmacogn*. 2014; 24 (1): 25–32.
15. Kubezka KH. New approaches in essential oil analysis using polymer coated silica fibers. In: Franz Ch, Mathé A, Buchbauer G. (Eds.). *Essential Oils, Basic and Applied Research. Proceedings of the 27<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils*; 8 – 11 september 1996; Vienna. Carol Stream: Allured Publishing Corp; 1997. pp. 139-146.

## ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA REACTIVIDAD COMPARADA DE LOS ANIONES TIOACETATO Y TIOBENZOATO FRENTE AL BIS-(2,4-DINITROFENIL)-ÉTER Y AL BIS-(2,4- DINITROFENIL)-SULFURO

Jorge Cappetta<sup>a\*</sup> César Alfonso Micheli<sup>a</sup>

### RESUMEN

Mediante metodologías computacionales, empleando los programas Mecánica Molecular y PM3 (semiempírico) se estudian comparativamente la sustitución nucleofílica aromática bimolecular de cuatro reacciones de las especies del título de este trabajo. Los resultados obtenidos se comparan con el comportamiento cinético observado experimentalmente.

El análisis energético aproxima las energías libres de activación correspondientes y permite establecer: una escala de reactividad de las reacciones objeto de estudio, como así también de la nucleofilia y electrofilia relativas de los reactivos involucrados en la primera etapa.

Además, los datos energéticos obtenidos se cotejan con determinaciones simuladas de una parte de los efectos de impedimento estérico relacionados con reactivos e intermedios investigados.

Los resultados de estas comparaciones se correlacionan e interpretan haciendo uso de los criterios mecanísticos básicos de la química orgánica.

**Palabras clave:** Sustitución nucleofílica aromática bimolecular, compuestos orgánicos del azufre bivalente, química orgánica computacional, reactividad comparada, modelización de la interacción nucleófilos-sustratos, impedimento estérico.

### ABSTRACT

Though the use of informatics programs, at level of Molecular Mechanics and PM3 (semiempirical) programs four reactions involving bimolecular aromatic substitution are analyzed and their energetic and stereochemical results are compared with the average reaction rates of the experimental reactions.

The energetic analysis approaches the free energies corresponding activation and enables us to determine a reactivity scale for the studied reactions as well as for the nucleophilic and electrophilic reactivities relative scale involved in their first part.

The energetic results are compared with the modeling determinations of the effect of the steric impediment related to the investigated reactivities and intermediates.

Results for these comparisons are correlated and interpreted using organic chemistry basic mechanism criteria.

---

<sup>a\*</sup> Instituto de Química Básica y Aplicada (IQBA) – Centro de Investigaciones Enseñanza Experimental (CICEE)  
– Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEQyN) - Universidad de Morón. Cabildo 134, Morón  
(1708) Prov. Buenos Aires, República (54-11) 5627-2000. jorgecappetta@yahoo.com

**Key Words:** Nucleophilic aromatic bimolecular substitution, bivalent sulphur organic compounds, computational organic chemistry, compared reactivity, modeling of the interaction between the substrate and the nucleophile, steric impediment.

## INTRODUCCIÓN

La química orgánica del azufre bivalente de aniones tiocarboxílicos, tioéteres, tioles, tiofenoles y tioésteres<sup>1</sup> abarca reacciones, algunas de las cuales ocurren en los seres vivos o están con ellos relacionadas estructural y/o metabólicamente. Entre las mencionadas, muchas son de gran importancia en bioenergética, además de participar en el mecanismo de acción de importantes enzimas y coenzimas<sup>2-4</sup>.

Las moléculas cuya reactividad estudiamos comparativamente en este trabajo pertenecen a algunas de las mencionadas familias de compuestos o presentan grupos funcionales análogos donde el oxígeno reemplaza al azufre. Entendemos que estas moléculas podrían ser de utilidad como “compuestos modelo”, para extrapolar datos proporcionados por su estudio a casos más complejos que involucran también mecanismos bioorgánicos<sup>5</sup>.

Nos hemos propuesto encarar computacionalmente, en este trabajo, la primera etapa de la reacción general de la figura 1, comparando la reactividad de las siguientes cuatro combinaciones:

### Presentación general de las cuatro reacciones

- (I) Bis-(2,4-dinitrofenil) tioéter con anión tioacetato.
- (II) Bis-(2,4-dinitrofenil) tioéter con anión tiobenzoato.
- (III) Bis-(2,4-dinitrofenil) éter con anión tioacetato.
- (IV) Bis-(2,4-dinitrofenil) éter con anión tiobenzoato.

Abreviaturas utilizadas:

Bis-(2,4-dinitrofenil)-sulfuro = Sulfuro = Ø2S

Bis-(2,4-dinitrofenil)-éter = Éter = Ø2O

Anión Tioacetato = TA(-)

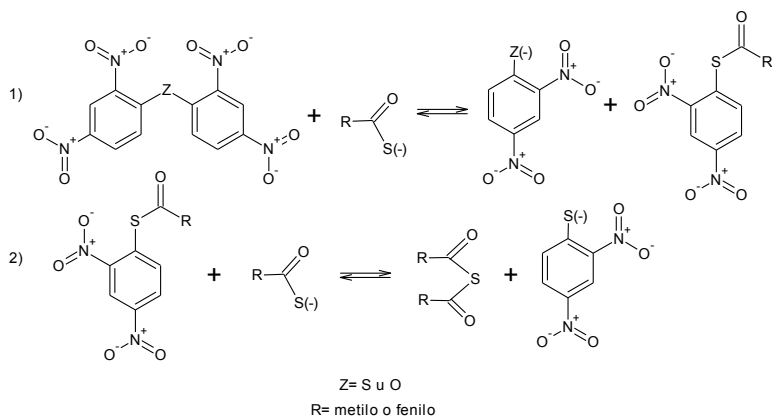
Anión Tiobenzoato = TB(-)

HyperChem = Hyp.

Gaussian = Gau.

Intermedio de Meisenheimer = I.M.

Y además, nuestro propósito es comparar los resultados obtenidos entre sí y cotejarlos con las velocidades medias que fueron determinadas por nosotros en un trabajo anterior publicado<sup>6</sup>, a los efectos de verificar, si las metodologías computacionales sencillas empleadas por nosotros pueden adaptarse para la realización de estudios de reactividad comparada de sistemas análogos a los aquí investigados.



**Figura 1.** Formulación general de las dos etapas de las cuatro reacciones (I, II, III y IV)

Durante el desarrollo del trabajo experimental ya citado<sup>6</sup> hemos podido establecer el orden de reactividad relativa del bis-(2,4-dinitrofenil) éter y del bis-(2,4-dinitrofenil) tioéter, frente a los aniones tioacetato y tiobenzoato en metanol-acetona (1:1), siguiendo el desarrollo de dichas reacciones por HPLC contra testigos. Los aniones tioacetato y tiobenzoato actúan como reactivos nucleofílicos frente a ambos sustratos, atacándolos mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica aromática bimolecular.

Las velocidades medias experimentales observadas son las reportadas en tabla 1:

**Tabla 1.** Velocidades medias experimentales

REACCIÓN	$V_{\text{media}} \times 10^{-7}$ (M/min.)
(I) $\text{O}_2\text{S} + \text{TA}(-)$	31,00
(II) $\text{O}_2\text{S} + \text{TB}(-)$	17,70
(III) $\text{O}_2\text{O} + \text{TA}(-)$	4,44
(IV) $\text{O}_2\text{O} + \text{TB}(-)$	0

Las velocidades medias se calcularon a partir de las curvas de concentración de los reactivos sulfuro y éter versus tiempo (entre 0 y 22,5 minutos)<sup>6</sup>.

En el trabajo que desarrollamos a continuación se cotejan estos datos con resultados energéticos y estereoquímicos obtenidos mediante metodologías computacionales, empleando los programas Mecánica Molecular y PM3 (semiempírico)<sup>7-9</sup>.

Se fundamenta a continuación la elección de los mencionados programas.

Se observó que al optimizar las estructuras de algunos intermedios de Meisenheimer hay problemas de deformación del enlace C-S y se detectaron también problemas de hipervalencia en el azufre, por ejemplo cuando se emplearon cálculos DFT con base 3-21g\* y con bases más altas como 6-31+g(d). Por ello se eligió el programa PM3 del software Gaussian 09W e HyperChem, a fin de comparar los resultados obtenidos entre ellos, resultando además este programa consistente con los datos experimentales: se respeta el orden de los “escalones” (si bien no las distancias relativas).

También se trabajó previamente con el programa PM6 (que es superior al programa PM3) del software Gaussian09W, no obteniéndose mejores resultados que al aplicar el programa PM3 del mismo software Gaussian 09W, por tal razón elegimos este último.

## METODOLOGÍA

### Software utilizado:

- HyperChem Release 8.0.10 (para Windows)
- Gaussian 09W Revisión – C.01 (para Windows)
- Gauss View 5.0.9 (editor gráfico del programa Gaussian 09W)

### Modelización

En primera instancia se realizó el modelado molecular de todas las estructuras involucradas en la primera etapa de reacción, es decir, la estructura de los sustratos, reactivos, intermedios de reacción y productos.

Para ello se optimizó, inicialmente, modelos y energías por medio del programa mecánica molecular MM+ y luego se optimizó con el programa semiempírico PM3 del software HyperChem. Se realizó el ajuste del tipo de átomos en cada estructura, según los conocimientos teóricos de química orgánica y se tomó en cuenta la misma precisión para obtener el modelado de todas las estructuras.

Al optimizar las moléculas con MM+ y luego con PM3 se obtuvieron los resultados que se observan en la tabla 2. Los valores de energías de cada molécula están expresados en kcal/mol, utilizando un  $\text{gradiente}=1 \times 10^{-3}$  para los cálculos con el software HyperChem y un  $\text{gradiente}$  que usualmente oscila entre 2,0 a  $9,0 \times 10^{-9}$  para los cálculos realizados con el software Gaussian.

Por medio del método semiempírico PM3 (en el software HyperChem) utilizando como estructura inicial la molécula ya optimizada por MM+, se obtiene como resultado: la energía de unión de estas moléculas. Esta energía se calcula haciendo la diferencia entre la energía total que se obtiene con el método utilizado y la energía de los átomos aislados infinitamente separados.

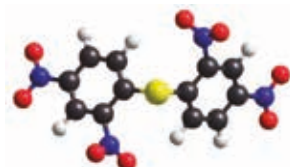
El mismo proceso de optimización inicial (MM+ y luego PM3) se realizó paralelamente con el software Gaussian 09W para obtener valores simulados de energía mejor ajustados, que

además permitieron evaluar los efectos de solvatación en las comparaciones efectuadas. Cuando se analizaron efectos de impedimento estérico, determinando distancias interatómicas con fines comparativos, se usó el programa MM+, puesto que pone más en evidencia los mencionados efectos.

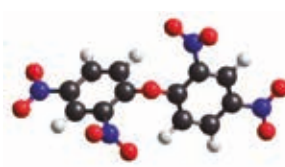
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Presentación de modelos y tablas

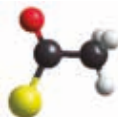
#### Modelos de sustratos, nucleófilos e intermedios de Meisenheimer en fase gaseosa con PM3 (Hyp.)



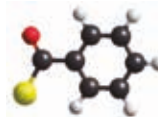
Bis-(2,4-dinitrofenil)-sulfuro



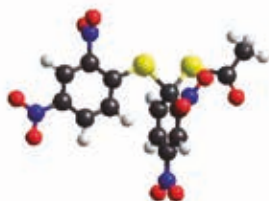
Bis-(2,4-dinitrofenil)-éter



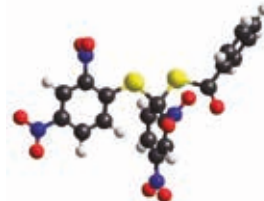
Anión tioacetato



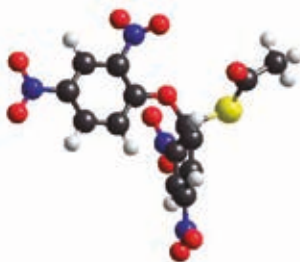
Anión tiobenzoato



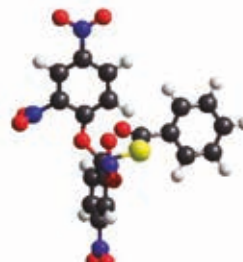
I.M. sulfuro-tioacetato



I.M. sulfuro-tiobenzoato



I.M. éter-tioacetato



I.M. éter-tiobenzoato



**Tabla 2.** Energías calculadas (kcal/mol).

REACTIVOS E INTERMEDIOS	E(MM) Hyp. (fase gas.)	E(PM3) Hyp. ( fase gas. )	E(PM3) Gau. ( fase gas. )	E(PM3) Gau. (metanol)
Sulfuro	14,12	-3311,05	47,38	22,06
Éter	10,26	-3351,73	-1,34	-27,53
Anión Tioacetato	1,45	-693,75	-69,77	-134,83
Anión Tiobenzoato	5,19	-1620,13	-37,78	-103,31
I.M. Sulfuro-tioacetato	15,46	-4048,98	-65,59	-118,02
I.M. Sulfuro-tiobenzoato	21,50	-4972,27	-31,03	-82,17
I.M. Éter-tioacetato	17,90	-4085,92	-111,06	-163,23
I.M. Éter-tiobenzoato	27,52	-5002,82	-75,56	-128,95

E(MM): Energía estérica de la molécula (energía potencial estérica), expresada en kcal/mol.  
 E(PM3) HyperChem: Sumatoria de la energía electrónica total, denominada “energía de unión”, expresada en kcal/mol.

E(PM3) Gaussian: Sumatoria de la energía electrónica total y la repulsión entre los núcleos en la molécula, expresada en kcal/mol. No es igual a la energía PM3 del programa HyperChem

**Tabla 3.** Comparativa de variaciones de energías cotejadas con velocidades medias experimentales.

REACCIÓN	$V_{media} \times 10^{-7}$ (M/min.) (metanol-acetona)	$\Delta E(\text{PM3})$ Gau. (metanol) kcal/mol	$\Delta E(\text{PM3})$ Gau. ( fase gas. ) kcal/mol
(I) $\text{O}_2\text{S} + \text{TA}(-)$	31,00	-5,25	-43,19
(II) $\text{O}_2\text{S} + \text{TB}(-)$	17,70	-0,91	-40,63
(III) $\text{O}_2\text{O} + \text{TA}(-)$	4,44	-0,87	-39,95
(IV) $\text{O}_2\text{O} + \text{TB}(-)$	0	1,89	-36,43

I.M.: Intermedio de Meisenheimer.

$\Delta E(\text{PM3}) = E \text{ I.M.} - \sum E \text{ Reactivos}$ , es la variación de energía PM3 entre el I.M. y la suma de los reactivos, que entendemos se aproxima a la energía de activación correspondiente a la primera etapa de cada reacción, en la hipótesis que la energía del I.M. pueda confundirse con la energía del estado de transición de la etapa limitante.

**Tabla 4.** Comparativa de reactividades promedio (permite evaluar nucleofilias y electrofilias relativas de aniones y sustratos).

PROMEDIOS	$V_{\text{media}} \times 10^{-7}$ (M/min.) (metanol-acetona)	$\Delta E(\text{PM3})$ Gau. (metanol) kcal/mol	$\Delta E(\text{PM3})$ Gau. ( fase gas. ) kcal/mol
(I)+(II)/2	24,35	-3,08	-41,91
(III)+(IV)/2	2,22	0,51	-38,19
(I)+(III)/2	17,72	-3,06	-41,57
(II)+(IV)/2	8,85	0,49	-38,53

Se han cotejado e interpretado los datos cinéticos experimentales con los energéticos obtenidos computacionalmente arriba tabulados, acorde con los siguientes criterios:

- La primera etapa de cada reacción considerada no es significativamente influenciada en su desarrollo cinético por la segunda<sup>6</sup>.
- El mecanismo común, subyacente a las primeras etapas que comparamos es de sustitución nucleofílica aromática bimolecular <sup>10-13</sup> que generalmente, permite confundir la energía del intermedio de Meisenheimer (I.M.) con la energía del estado de transición que lo antecede, como hacemos aquí.
- Se asume que las velocidades medias determinadas experimentalmente que reportamos puedan equipararse en primera aproximación a las correspondientes constantes cinéticas de la primera etapa de cada reacción a los fines comparativos, hallándose además estas últimas en relación exponencial inversa con las energías libres de Gibbs de activación estándar molar ( $\Delta G_0^\ddagger$ )<sup>15</sup>, acorde con la formulación termodinámica del estado de transición.
- Las variaciones de energía:  $\Delta E(\text{PM3}) = E \text{ I.M.} - \sum E \text{ Reactivos}$ , calculadas mediante los software HyperChem y Gaussian<sup>11,12</sup> se asimilan a las correspondientes variaciones
- de energía interna de activación estándar molar ( $\Delta U_0^\ddagger$ ).
- Además, se consideran los valores  $\Delta U_0^\ddagger$  comparables con los correspondientes valores
- $\Delta H_0^\ddagger$  (entalpía de activación estándar molar), en solución y en fase gaseosa, considerando en este último caso que  $\Delta H_0^\ddagger = \Delta U_0^\ddagger + RT\Delta n(\text{g})$ , donde  $\Delta n(\text{gas})$  es, en los casos por nosotros considerados, siempre uno<sup>16</sup>.
- Es decir que, en las comparaciones entre las primeras etapas los valores de  $\Delta H_0^\ddagger$  y  $\Delta U_0^\ddagger$  difieren por la misma constante.
- Asumimos entonces que, siempre en primera aproximación, resulta ser:
- $\Delta G_0^\ddagger = \Delta H_0^\ddagger - T\Delta S_0^\ddagger = \Delta A_0^\ddagger = \Delta U_0^\ddagger - T\Delta S_0^\ddagger$ , siendo  $\Delta A_0^\ddagger$  la energía libre de activación de Helmholtz estándar molar<sup>16</sup>.
- Entendemos que la variación  $\Delta S_0^\ddagger$  aquí considerada es igual en los cuatro casos que comparamos en este trabajo en cuanto es la que se halla asociada a la variación de grados de libertad vinculados con  $\Delta n$ .
- La variación de entropía asociada a la variación de grados de libertad, propios de las estructuras moleculares e iónicas, involucradas en la transición desde los reactivos hasta el correspondiente intermedio de Meisenheimer, se analizarán separadamente en

este trabajo, aproximando las mismas mediante el uso de criterios estereoquímicos de impedimento estérico fundamentados en la determinación y comparación de distancias interatómicas.

### **Comparación e interpretación de los valores computacionales y experimentales calculados**

El análisis de la tabla 3 indica que las variaciones de energía calculadas en fase gaseosa y en metanol presentan un ordenamiento que se corresponde con el presentado por las velocidades medias determinadas experimentalmente en metanol-acetona (1:1):



generando el solvente polar prótico un efecto de disminución general de reactividad pero respetando el orden tal como fuera calculado en fase gaseosa.

Este hecho es relacionable con la fuerte solvatación sufrida por los aniones en solvente polar prótico.

Analizando la tabla 4 y comparando, en cada una de las tres columnas, el promedio de los valores correspondientes a las reacciones I y II con el análogo promedio referido a las reacciones III y IV, se infiere que el sulfuro es mejor sustrato que el éter frente a ambos aniones, en el contexto de las mismas.

Razonando análogamente con los promedios de I y III, y de II y IV, se concluye que el anión tioacetato es mejor nucleófilo que el anión tiobenzoato frente a ambos sustratos, en el correspondiente contexto.

Volviendo a analizar la tabla 3 en función de los datos presentados en la tabla 4 se observa que el orden teórico resulta ser en todos los casos acorde con el orden experimental.

Cabe resaltar también que en la reacción I convergen el mejor nucleófilo y el mejor electrófilo, y en la IV el peor nucleófilo y el peor electrófilo; mientras en las II y III la convergencia es mixta y la II prevalece sobre la III. Lo que está indicando que los nucleófilos solo influyen secundariamente en el orden de reactividad global  $I > II > III > IV$  ya establecido; y que es en las reacciones II y III donde mejor se evidencia, aunque sea secundariamente, el efecto de los mismos.

Datos de la tabla 3 indican que son los electrofílicos los principales condicionantes del orden de reactividad presentado por las cuatro reacciones que comparamos, en efecto: la mayor reactividad se asocia a las reacciones I y II, respecto a las III y IV).

Todo lo afirmado vale en fase gaseosa, en metanol (estudio teórico) y en metanol-acetona (estudio experimental).

El método de la resonancia, cualitativamente aplicado, da cuenta de la mayor estabilidad (menor reactividad) del éter cuando se la compara con la del sulfuro. En efecto, la conjugación C aromático-oxígeno respecto a la C aromático-azufre es más efectiva (téngase en cuenta la diferencia de volumen atómico entre oxígeno y azufre).

Además, la mayor estabilidad del anión tiobenzoato respecto al anión tioacetato (resonancia

del grupo fenilo, mientras que el grupo metilo solo hiperconjugaba) avala la mayor reactividad del anión tioacetato.

Considerando en general el efecto del solvente polar y prótico (aunque la proticidad resulte disminuida en la mezcla solvente utilizada experimentalmente respecto al metanol, usado para el análisis computacional), podemos concluir que:

- En las cuatro reacciones comparadas el solvente produce una disminución general de reactividad pero sin alterar el orden de la misma: I > II > III > IV.
- También respeta el orden de nucleofilia y electrofilia relativos, como se estableció en fase gaseosa.

### **Análisis e interpretación de los principales efectos estéricos “en fase gaseosa”, involucrados en la primera etapa de las cuatro reacciones aquí estudiadas**

**Tabla 5.** Distancias principales asociadas al “efecto orto cercano” (Å) con MM+ (Hyp.).

SUSTRATOS E I.M.	N(-)io - Ho	O(-)ico - Ho	O(-)ilo - Ho
Ø <sub>2</sub> S	5,120	5,029	6,385
Ø <sub>2</sub> O	3,550	2,964	4,832
(I)	3,629	3,473	4,900
(II)	3,538	3,843	4,453
(III)	3,300	3,829	4,078
(IV)	4,513	3,679	5,734

N(-)io - Ho: distancia entre el No (unido al anillo con carga (-) que está a la izquierda en el esquema) y el Ho del otro anillo.

O(-)ico - Ho: distancia entre el O cercano unido al No (unido al anillo con carga (-) que está a la izquierda en el esquema) y el Ho del otro anillo.

O(-)ilo - Ho: distancia entre el O lejano unido al No (unido al anillo con carga (-) que está a la izquierda en el esquema) y el Ho del otro anillo. (ver figura2).

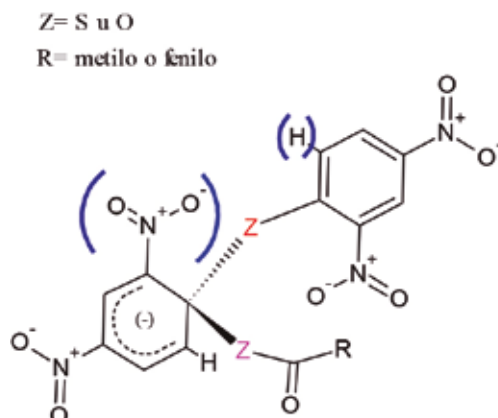
**Tabla 6.** Distancias principales asociadas al “efecto orto lejano” (Å) con MM+ (Hyp.).

SUSTRATOS E I.M.	Ndo - H(-)io	Odco - H(-)io	Odlo - H(-)io
Ø <sub>2</sub> S	5,120	5,029	6,385
Ø <sub>2</sub> O	3,550	2,964	4,832
(I)	5,426	5,044	6,684
(II)	5,382	5,861	6,012
(III)	4,668	5,053	5,350
(IV)	2,900	3,195	3,576

Ndo - H(-)io: distancia entre el No (unido al anillo sin carga que está a la derecha en el esquema) y el H(-)io unido anillo con carga (-).

Odco - H(-)io: distancia entre el O cercano unido al No (unido al anillo sin carga que está a la derecha en el esquema) y el H(-)io unido al anillo con carga (-).

Odlo - Ho: distancia entre el O lejano unido al No (unido al anillo sin carga que está a la derecha en el esquema) y el H(-)io anillo con carga (-). (ver figura 3).



**Figura 2.** Formulación indicante el efecto orto cercano en un I.M. tipo (ver los paréntesis).



**Figura 3.** Formulación indicante el efecto orto lejano en un I.M. tipo (ver los paréntesis).

**Tabla 7.** Comparativa y abarcante que presenta (fila por fila) el promedio de las distancias (Å) del efecto orto cercano (columna A) y lejano (columna B) y su promediación final en la columna C.

SUSTRATOS E I.M.	COLUMNA (A)	COLUMNA (B)	COLUMNA (C)
	$\Sigma(\text{distancias ortos cercanas})/3$	$\Sigma(\text{distancias ortos lejanas})/3$	Promedio filas de las columnas (A) y (B)
$\text{O}_2\text{S}$	5,510	5,510	5,510
$\text{O}_2\text{O}$	3,782	3,782	3,782
(I)	4,000	5,718	4,859
(II)	3,940	5,750	4,845
(III)	3,730	5,020	4,375
(IV)	4,642	3,220	3,933

Columna (A): Promedio de los datos de la tabla 5.

Columna (B): Promedio de los datos de la tabla 6.

Los promedios de distancias obtenidos efectuando la lectura horizontal de las tablas 5 y 6 fueron reportados en las columnas A y B de la tabla 7 y se corresponden con lo denominado aquí como “efecto orto cercano y lejano”. Estos promedios fueron a su vez promediados y los valores finales aparecen ordenados en la columna C de la misma tabla y son los indicadores del “efecto de jaula” que se genera en el entorno donde se encuentran los carbonos electrofilicos C1 y C’1, sea del éter como del sulfuro, interaccionantes con el azufre nucleofílico y covalentemente unidos a éste en el correspondiente intermedio de Meisenheimer. Relacionamos así el “efecto de jaula” con el concepto de impedimento estérico en el mencionado entorno.

### **Impedimento estérico comparado presente en éter y sulfuro**

En primer lugar se observa que las dos distancias (orto nitro- H orto) (columnas A y B de la tabla 7) son iguales entre sí en el éter y respectivamente también lo son en el sulfuro, pero mayores en el sulfuro. Por lo tanto en este análisis no hace falta distinguir entre “efecto orto cercano y lejano”.

Además, el impedimento estérico que presenta el éter respecto al sulfuro queda puesto en evidencia en la tabla 6 donde los oxígenos del grupo nitro en C<sub>2</sub> con el hidrógeno en C’<sub>6</sub> y los oxígenos del grupo nitro en C’<sub>2</sub> con el hidrógeno en C<sub>6</sub> se hallan más cerca en el primer sustrato que en el segundo.

En efecto, el promedio de las distancias de los átomos constituyentes del grupo orto nitro de un anillo respecto al hidrógeno en orto del otro anillo es de 5,510 Å para el sulfuro y de 3,782 Å para el éter.

Esto, sugiere que los carbonos 1 y 1', se hallan estéricamente más protegidos en el éter que en el sulfuro, frente al ataque del nucleófilo, quedando un anillo más rotado respecto al otro en el éter, lo que lleva a que los carbonos electrofílicos resulten más desprotegidos en el sulfuro. A los efectos, téngase en cuenta también que la distancia C<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>' en el sulfuro es 3,190 Å y en el éter es 2,387 Å, lo que también favorece la mencionada rotación para el éter, por el mayor impedimento provocado por los grupos en orto antes mencionado.

Cabe destacar además (allí hasta donde el impedimento estérico influye) que el estudio aquí expuesto presenta, en lo que hace a los sustratos éter y sulfuro, buena concordancia con hechos experimentales anteriormente determinados por nosotros<sup>6,14</sup>.

Haciendo ahora referencia a los nucleófilos el anión tioacetato, poseyendo la misma carga que el anión tiobenzoato y menor volumen donde ésta se distribuye, resulta más reactivo que el anión aromático.

### **Impedimento estérico parcial que se presenta y compara en los intermedios de Meisenheimer de la primera etapa de las reacciones aquí investigadas**

El análisis de los valores representados en la columna C de la tabla 7, indica que el apiñamiento estérico en los intermedios de Meisenheimer se presenta en el orden:

IV> III>II>I, asociable a tensionamientos cada vez mayores de izquierda a derecha, que se corresponden bien con las variaciones de energía que determinamos y comparamos.

El impedimento estérico pudo así analizarse separadamente del contexto energético que los abarca, con el objetivo de mejor evidenciar su aporte a las variaciones energéticas en cuestión, más allá de que sea determinante o solamente contribuyente a las mismas.

Por último, cabe resaltar que el análisis estereoquímico realizado (además de resultar limitado por la restringida elección de las distancias comparadas para su determinación) considera separadamente el impedimento estérico de los reactivos y de los intermedios de Meisenheimer correspondientes, pero no la variación espacial progresiva entre los átomos de los reactivos que se reacomodan a lo largo de la coordenada de reacción hasta alcanzar la conformación espacial del estado de transición o de un casi equivalente intermedio de Meisenheimer.

Igualmente, el mencionado análisis ayuda a mejor comprender las causas de las diferencias de reactividad analizadas durante este estudio.

## **CONCLUSIONES**

- Los programas computacionales empleados permitieron investigar las cuatro reacciones objeto de nuestro estudio, comparando mediante técnicas de simulación la primera etapa de las mismas en su desarrollo energético y cotejar los resultados así obtenidos con los

datos de velocidades medias experimentalmente determinadas en un trabajo anterior<sup>6</sup>.

El orden de reactividades resultó ser en ambos casos:  $I > II > III > IV$ , ejerciendo el solvente polar prótico una disminución general de reactividad, pero sin alterar el mencionado orden.

- De los nucleófilos involucrados el anión tioacetato se presenta como el mejor nucleófilo en el contexto de las reacciones comparadas y el sulfuro como el mejor electrófilo.
- Los efectos estéricos analizados en fase gaseosa, separados de los valores energéticos que los engloban, indican que el éter resulta ser más impedido estéricamente en el entorno susceptible de ataque nucleofílico que el sulfuro correspondiente. Además, el impedimento estérico relativo estimado para los cuatro intermedios de Meisenheimer se correlaciona con el orden de reactividad por nosotros propuesto energética y experimentalmente, aun sin ser el único causante del mismo.
- Cabe resaltar que gran parte de los hechos expuestos y analizados en este trabajo los hemos descrito e interpretado haciendo uso de conceptos pertenecientes a la Química Orgánica básica, lo que abre las puertas para analizar la posibilidad de adaptar programas, modelos y criterios interpretativos relativamente sencillos para incorporarlos en el ámbito educacional (nivel terciario y universitario) al desarrollo de cursos de introducción a la Química Orgánica Computacional básica, aplicada al estudio comparativo y semicuantitativo de reacciones semejantes a las aquí investigadas que presenten el mismo mecanismo subyacente.
- Además, entendemos que criterios similares a los aquí desarrollados podrían ser útiles en el ámbito de la investigación química básica y/o aplicada, para delinear estrategias en la comparación de reactividades haciendo uso de programas computacionales sencillos antes de acudir a otros más complejos o de implementar metodologías a nivel experimental que permitan un adecuado chequeo, pero que podrían requerir un alto costo en reactivos, equipamiento y mayores tiempos operativos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Decano de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la Universidad de Morón: Dr. Aquiles Ferranti, por la confianza otorgada a nuestras investigaciones.

Al Dr. David Kuczynski, por la asidua colaboración prestada cuando se desempeñó como Director de Investigaciones de la Facultad y que actualmente continúa prestándonos.

A la Dra. Ethel Coscarello, por habernos iniciado en la metodología de la Química Computacional, en los albores del esfuerzo por nosotros realizado al desarrollar este trabajo.



**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Patai S. The chemistry of the thiol group, Part I y II. New York: John Wiley & Sons. 1974. p.81-86, 125- 131.
2. Fox MA, Whitesell, J. K. Química Orgánica. 2<sup>da</sup> edición. México DF: Ed. Pearson; 2000. Cap. 20 y 22.
3. Voet D, Voet JG. Bioquímica. Parte III, 3<sup>ra</sup> edición. Buenos Aires: Ed. Medica Panamericana; 2006. p. 471-562.
4. Bruice TC, Benkovic SJ. Bioorganic Mechanisms. Vol. I. New York: Ed. Benjamin WA; 1966. Cap I y III.
5. Micheli CA. Introducción a los mecanismos bioorgánicos. Morón: Ed. Praia; 2015. p. 22-23.
6. Gallo IM, Caresana AM, Cappetta JE, Micheli CA. Reactividad del bis-(2,4-dinitrofenil)-éter y del análogo tioéter, frente a aniones carboxílicos y tiocarboxílicos. *Rev Soc Quím Perú*. 2012; 78 (2): 91-104.
7. Foresman JB, Frisch A. Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods. 2<sup>nd</sup> edition. Pittsburgh: Gaussian; 1996. p.208-211.
8. Bachrach SM. Computational Organic Chemistry. New York: John Wiley & Sons; 2007. p.373-391.
9. Rogers, D.W. Computational Chemistry using the PC. 3<sup>rd</sup> Edition. New York: John Wiley & Sons; 2003. p.93-130; 279-298.
10. Bunnett JF, Zahler RE. Aromatic Nucleophilic Substitution Reactions. *Chem. Rev*. 1951; 49 (2): 273-412.
11. Bunnett JF, Meritt WD. The nucleophilic reactivity of sodium thiophenoxide with aromatic substrates. *J Am Chem Soc*. 1957; 79 (22): 5967-5969.
12. Reinheimer JD, Hostetler W. The aromatic nucleophilic substitution reaction: the effect of initial concentration on the rate of the reaction of MOH on 2,4 dinitrohalobenzenes. *Ohio J Sc*. 1964; 64 (4): 275-283.
13. Guanti G, Dell'Erba C, Thea S, Leandri G. Reactivity of thiophenoxide ion toward o- and p-halogenonitrobenzenes. *J Chem Soc Perkin Trans 2*. 1975: 389-391.
14. Wright V, Gallo I, Gonzalez P, Sciarrotta E, Micheli CA. Introducción al estudio de la reactividad del bis-(2,4-dinitrofenil)- éter y del bis-(2,4-dinitrofenil)- tioéter frente al anión metóxido en acetona. *Quím Nat*. 2010; 8: 35-50.
15. Chang R. Fisicoquímica para las Ciencias Químicas y Biológicas, 3<sup>ra</sup> Edición. México DF: Mc Graw-Hill, Interamericana; 2008. Cap. 12, p. 475-479.
16. Waser J. Termodinámica Química Fundamental. Baecelona: Ed. Reverté; 1972. Cap. 2 y 5, p.48-49,104-107.

## **INFLUENCIA DEL NIVEL DE FERMENTACIÓN DEL VINO BASE SOBRE ALGUNOS COMPUESTOS VOLÁTILES DEL PISCO PERUANO DE UVA ITALIA**

Yasser Hidalgo<sup>\*a</sup>, Beatriz Hatta<sup>a</sup>, Juan Carlos Palma<sup>b</sup>

### **RESUMEN**

Se investigó la influencia del nivel de fermentación del vino base sobre algunos compuestos volátiles en el pisco, tales como: ácido acético, alcoholes superiores, ésteres, acetaldehído y metanol. Para evaluar el efecto del nivel de fermentación, durante esta etapa se obtuvieron cinco muestras de vino base con diferentes densidades de corte; para luego ser de inmediato destiladas. Los resultados indicaron que los piscos provenientes de vinos base con menores niveles de fermentación, expresados con mayores densidades de corte (990; 1000; 1010; 1025 y 1040 g/L), presentan mayores contenidos de ácido acético (0.15, 0.16, 0.17, 0.17 y 0.18 g/L), propanol (72.15, 76.33, 82.25, 89.86 y 95.50 mg/100 mL alcohol anhidro), acetato de etilo (22.00, 30.72, 34.26, 39.06 y 49.68 mg/100 mL alcohol anhidro), acetaldehído (22.71, 40.52, 48.69, 58.51 y 78.62 mg/100 mL alcohol anhidro) y metanol (39.22, 40.27, 43.33, 51.30 y 57.95 mg/100 mL alcohol anhidro); y menores contenidos de alcohol iso/ter-amílico (122.83, 118.98, 115.78, 102.88 y 100.11 mg/100 mL alcohol anhidro).

**Palabras clave:** Destilados, pisco, pisco mosto verde, nivel de fermentación, compuestos volátiles.

## **INFLUENCE OF LEVEL FERMENTATION OF BASE WINE IN SOME VOLATILE COMPOUNDS OF PERUVIAN ITALIA GRAPE PISCO**

### **ABSTRACT**

The influence of level fermentation of base wine in some volatile compounds in Pisco obtained therefrom were studied, such as: acetic acid, higher alcohols, esters, acetaldehyde and methanol. In order to evaluate the effect of level fermentation, during this stage five base wine samples with five different cut densities were obtained; to be distilled straight away. The results indicated that piscos obtained from musts with lower fermentation levels, expressed by higher cut densities (990; 1,000; 1,010; 1,025 and 1,040 g/L), show higher acetic acid

<sup>1</sup> Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Universidad s/n, Lima 12, Perú.

\* yasser\_hds@yahoo.com

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias – Dpto. de Química, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Universidad s/n, Lima 12, Perú.

(0.15, 0.16, 0.17, 0.17 and 0.18 g/L), propanol (72.15, 76.33, 82.25, 89.86 and 95.50 mg/100 mL anhydrous alcohol), ethyl acetate (22.00, 30.72, 34.26, 39.06 and 49.68 mg/100 mL anhydrous alcohol), acetaldehyde (22.71, 40.52, 48.69, 58.51 y 78.62 mg/100 mL anhydrous alcohol) and methanol (39.22, 40.27, 43.33, 51.30 and 57.95 mg/100 mL anhydrous alcohol) contents; and lower iso/ter-amyl alcohol (122.83, 118.98, 115.78, 102.88 and 100.11 mg/100 mL anhydrous alcohol).contents.

**Key words:** Distillates, pisco, green must pisco, fermentation level, volatile compounds.

## INTRODUCCIÓN

El pisco peruano es el aguardiente obtenido exclusivamente por destilación de mostos frescos de “uvas pisqueras” recientemente fermentados, utilizando métodos que mantengan el principio tradicional de calidad establecido en las zonas de producción reconocidas<sup>1</sup>.

Desde su aparición en el mercado, la elaboración de pisco tipo “Mosto Verde” ha tomado un protagonismo interesante y ha generado diversos comentarios, en su mayoría favorables, ya que, al ser destilado a partir de mostos frescos incompletamente fermentados, le darían a éste ciertas características sensoriales particulares a su estructura y cierta sensación “aterciopelada” en boca. Sin embargo, hasta el momento el sustento técnico científico de este tipo ha sido insuficiente.

### **Materia prima**

Los controles se realizan en primer lugar sobre la uva, que cosechada convenientemente en recipientes no contaminantes como jabs de plástico deberá presentar un buen estado sanitario, exenta de restos de pesticidas o sustancias peligrosas que puedan influenciar el normal desarrollo de la fermentación alcohólica o transformarse en componentes volátiles tóxicos que pasen al destilado<sup>2</sup>.

En el transporte de uvas a granel hacia la bodega, la altura de la masa vitícola almacenada en los recipientes no deberá superar un metro, para evitar altas presiones que rompan los hollejos y que hagan fluir el mosto<sup>2</sup>.

### **Mosto**

El procesado de la uva, para la obtención del mosto, se debe realizar lo más rápido posible, para evitar la oxidación del mosto. Este proceso deberá hacerse en condiciones higiénicas óptimas para conservar en el mosto las bondades intrínsecas de la uva que luego harán parte de las características cualitativas del destilado<sup>2</sup>.

El prensado tiene por objeto extraer la solución acuosa contenida en las bayas así como ciertos compuestos del hollejo bajo el efecto de la presión. Esta operación se realiza en una prensa, que es en general un cilindro en el interior del cual la vendimia es comprimida, sea por el movimiento de uno o dos platos (prensas mecánicas) o por el inflado de una membrana

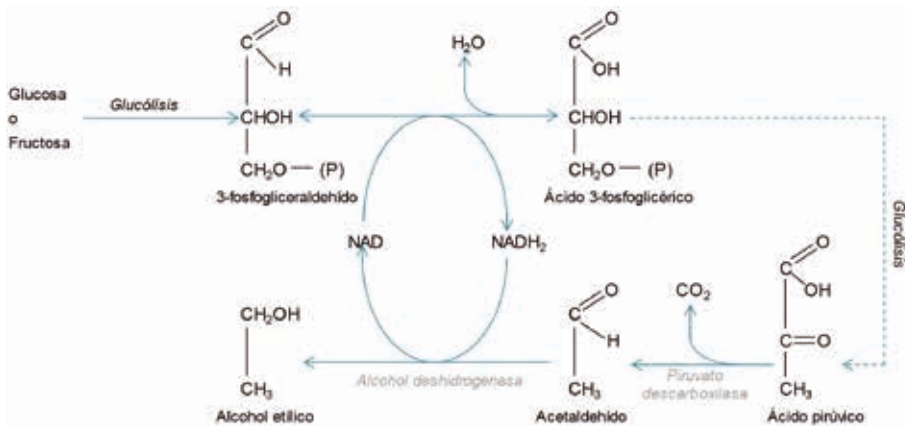
(prensas neumáticas). La presión aplicada debe ser progresiva y alcanzar valores finales bastante elevados pero no demasiado para no romper los raspones, los hollejos y las pepitas<sup>3</sup>.

La fermentación alcohólica del mosto debe realizarse en recipientes que no contaminen el vino base a obtenerse, que al ser un producto orgánico, es perecible<sup>2</sup>.

**Fermentación**

El poder reductor producido por la glucólisis, bajo la forma de NADH<sub>2</sub>, debe ser transferido a un receptor de electrones para regenerar NAD<sup>+</sup>. En la fermentación alcohólica no es el ácido pirúvico sino su producto de descarboxilación, es decir el acetaldehído el que sirve de aceptor final de electrones<sup>4</sup>. El NADH<sub>2</sub> proviene de la oxidación del 3-fosfogliceraldehído. Las dos reacciones correspondientes son interdependientes y constituyen una oxidoreducción (figura 1)<sup>5</sup>.

Desde el punto de vista teórico 100 gramos de azúcares producen alrededor de 50 gramos de alcohol y 50 gramos de gas carbónico<sup>6</sup>. Además del alcohol etílico, en la fermentación alcohólica se producen a partir del ácido pirúvico otros compuestos, donde destacan el ácido acético, ácido butírico, acetona, ácido láctico, acetoína, butanodiol-2,3, ácido fumárico, ácido oxalacético, ácido succínico, ácido propiónico, diacetilo, etc<sup>5</sup>.



**Figura 1.** Esquema de la fermentación alcohólica.

La mayoría de los ácidos orgánicos restantes son producidos durante la vía de síntesis de los ácidos grasos a partir de la malonyl-Coenzima A<sup>8</sup>. Los ésteres se forman por reacciones entre alcoholes y ácidos, bajo la acción de esterasas de las levaduras y directamente por condensación del precursor del ácido acético, el acetyl-CoA<sup>6</sup>.

La transformación de los aminoácidos de la uva, o los formados por la propia levadura, dan lugar a numerosos alcoholes superiores, que tienen más de dos átomos de carbono, tales como los alcoholes propílicos, butíricos o amílicos<sup>6</sup>.

## **Destilación**

Es una técnica usada para separar y seleccionar, mediante el uso del calor, componentes volátiles específicos a partir de una mezcla líquida (por ejemplo, el vino)<sup>9</sup>.

La elaboración de pisco será por destilación directa y discontinua, separando las cabezas y colas para seleccionar únicamente la fracción central del producto llamado cuerpo o corazón. Los equipos serán fabricados de cobre o estaño; se puede utilizar pailas de acero inoxidable<sup>1</sup>.

Los distintos compuestos destilados se pueden clasificar según la etapa en que destilan, tal como se muestra en la tabla 1<sup>10</sup>.

Algunas reacciones químicas tienen lugar en el curso de la destilación<sup>10</sup>:

- La hidrólisis de diversos constituyentes del vino.
- Formación de acetato de etilo.
- Formación de furfural, durante todo el calentamiento sobre las pentosas.
- Fijación de ácidos grasos y sulfuros por el cobre.
- Formación de glicerol en las partes descendentes del alambique, a partir de las sustancias grasas por reacción sobre el cobre caliente.

## **Componentes del pisco**

Se consideran componentes volátiles y congéneres del pisco, las siguientes sustancias: ésteres, furfural, ácido acético, aldehídos, alcoholes superiores y alcohol metílico<sup>1</sup>. Estos componentes están influenciados por varios factores durante el proceso de producción, entre los cuales podemos distinguir los siguientes<sup>11</sup>:

1. Sustancias de aroma primario: generadas a partir de la variedad de la uva.
2. Sustancias de aroma secundario: generadas durante la vinificación y durante el proceso de fermentación.
3. Aromas de sustancias generadas durante el proceso de destilación.
4. Aromas de sustancias generadas durante el proceso de maduración o envejecimiento.

**Tabla 1.** Etapa de destilación de algunos compuestos volátiles y su impacto en la calidad del pisco.

Compuestos volátiles	De cabeza	De cuerpo	De cola
<b>Positivos</b>	Ésteres (acetato de hexilo, acetato de 2-feniletilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo, decanoato de etilo, dodecanoato de etilo), terpenos (linalol, óxidos de linalol y nerol).	Acetato de 3-feniletilo, terpenos (hotrienol, $\alpha$ -terpineol, linalol).	Ésteres (lactato de etilo, succinato de dietilo), 2-feniletanol.
<b>Negativos</b>	Aldehídos, acetato de etilo, alcoholes superiores (propanol, isobutanol, hexanol, butanol, amílico, isoamílico), homólogos saturados de hexanol (cis-3-hexeno-1-ol, trans-2-hexeno-1-ol, trans-3-hexeno-1-ol), metanol.	Ácido isobutírico, metanol.	Furfural, ácido butírico, metanol.
<b>Neutros</b>	–	–	Ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales y métodos

#### Materia prima

Uva de la variedad Italia (*Vitis vinifera* L. var. Italia), procedente del fundo San Pablo en el distrito de Chíncha Baja, provincia de Chíncha, departamento de Ica.

#### Análisis fisicoquímicos

Determinación de componentes volátiles del pisco: metanol, furfural, acetaldehído, ácido acético, ésteres (acetato de etilo, acetato de isoamilo, formiato de etilo) y alcoholes superiores (propanol, isopropanol, butanol, isobutanol y alcohol iso/teramílico). Método cromatográfico según Norma Técnica Peruana NTP 211.03512.

#### Análisis estadístico

Los resultados se procesaron estadísticamente por análisis de varianza (ANOVA) y mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey a un nivel de significancia de 5%, procesados con el programa estadístico Minitab Release 14, para Windows.

### Metodología experimental

- Obtención del mosto: los racimos de uva Italia se procesaron en una prensa neumática para extraer el zumo y eliminar la piel y los racimos.  
El mosto tuvo una densidad inicial de 1,098 g/L y una acidez de 3,0 g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Fermentación: el mosto de uva Italia fue depositado en un tanque de acero inoxidable de 200 L con sistema de agitación y se agregó un pie de cuba con levadura seleccionada (levadura seca activa *Saccharomyces cerevisiae* Maurivin<sup>TM</sup>).  
Se introdujo el factor “nivel de fermentación”, extrayendo muestras de vino base con diferentes tiempos de fermentación (previa homogeneización) en recipientes previamente desinfectados, expresados en cinco diferentes densidades de corte. Estas fueron: 1,040 g/L; 1,025 g/L; 1,010 g/L; 1,000 g/L y 990 g/L, aproximadamente.  
La utilización de levadura seca activa comercial es una práctica común entre las bodegas vitivinícolas como “Bodegas & Viñedos Taberero S.A.C.”. Tiene entre sus principales ventajas permitir un comienzo rápido de la fermentación<sup>13</sup> e iniciar la fase exponencial de crecimiento en el menor tiempo posible<sup>14</sup>.
- Destilación: en un intervalo aproximado de 10 minutos desde la extracción de la muestra, se procedió a destilar aproximadamente 2.5 L de vino base en un alambique de cobre de 5 L de capacidad. Se separó al inicio de la destilación la primera fracción de destilado (cabeza) equivalente al 1% del volumen de vino a destilar y se cortó la misma a una graduación alcohólica de 42 °G.L aproximadamente.  
De acuerdo con Domenech<sup>15</sup>, en el Perú el porcentaje de cabeza eliminado (porcentaje al volumen del vino base a destilar) oscila entre 0,0 y 1,0%. En el presente trabajo se ha considerado 1,0% por ser el valor más usado en los estudios de investigación de origen nacional. Con respecto a la graduación alcohólica final del pisco, según Hatta<sup>10</sup>, 42 °G.L. es el grado alcohólico promedio de los piscos comerciales en el Perú.
- Conservación: los destilados se dejaron reposar durante tres meses en botellas de vidrio según lo recomendado por el Reglamento de la Denominación de Origen PISCO<sup>1</sup>, antes de someterlos a análisis.  
Luego de concluida esta etapa, los piscos fueron caracterizados determinando sus compuestos volátiles.

### Diseño experimental

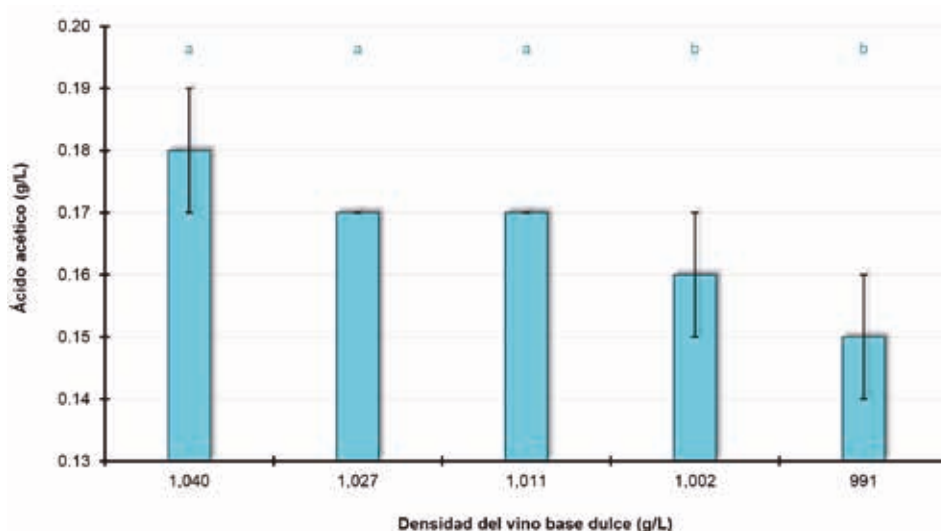
Para evaluar el factor “nivel de fermentación” del mosto, con sus niveles de densidad de corte: 1,040 g/L; 1,025 g/L; 1,010 g/L; 1,000 g/L y 990 g/L; se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres repeticiones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ácido acético

Tal como se observa en la figura 2, el contenido de ácido acético tuvo menores concentraciones en los piscos provenientes de mostos con mayores niveles de fermentación.

La utilización del ácido acético por las levaduras requiere primero una reducción a acetaldehído, favoreciendo la fermentación alcohólica en menoscabo de la pirúvica, con una disminución de la glicerina, pero con un aumento de los productos secundarios que pueden derivar del acetaldehído<sup>16</sup>. Es así que se observa una disminución del ácido acético a medida que aumenta el nivel de fermentación del mosto.



**Figura 2.** Contenido de ácido acético en los piscos provenientes de vinos base con diferentes niveles de fermentación.

Los contenidos promedio de ácido acético de los piscos en esta investigación, se encontraron por debajo del máximo permitido por el Reglamento de la Denominación de Origen PISCO (200 mg/100 ml A.A.)<sup>1</sup>, que es equivalente a 0,76 g/L.

### Propanol

Tal como se observa en la figura 3, el contenido de propanol tuvo menores concentraciones en los piscos provenientes de mostos con mayores niveles de fermentación. La diferencia resultó significativa entre todos los tratamientos.

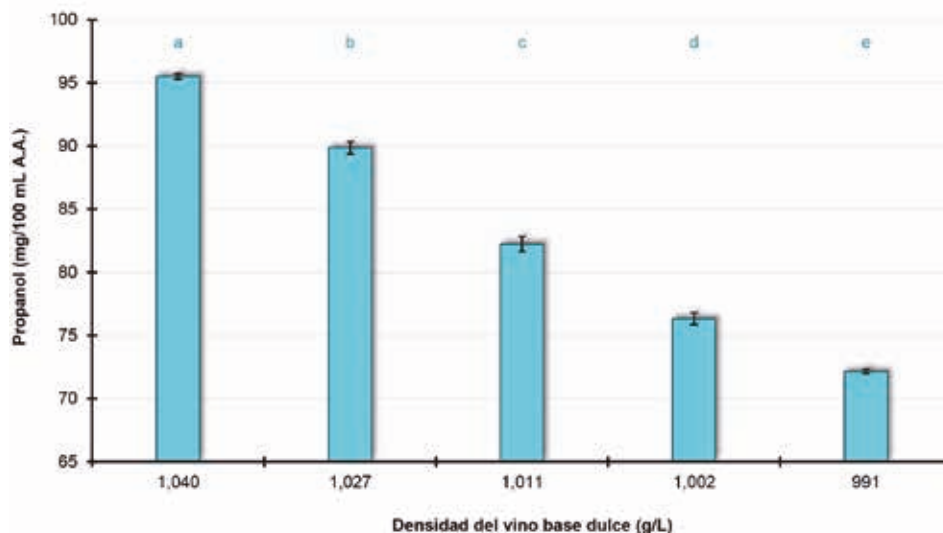
La formación de los alcoholes superiores en el curso de la fermentación alcohólica sucede linealmente con la producción de alcohol etílico para todos los alcoholes excepto para el propanol-1, que se forma fundamentalmente en las primeras fases de la fermentación<sup>16</sup>. En efecto, habiéndose realizado el muestreo de los mostos a partir de una densidad de 1,040 g/L (día 3 de la fermentación), no se esperaba un aumento en el contenido de propanol; ya que su biosíntesis tuvo lugar en los primeros días de la fermentación.

Una posible explicación del descenso en el contenido de propanol, a medida que aumenta el nivel de fermentación, podría haber sido la esterificación de este alcohol. Se ha encontrado



en algunos vinos blancos el acetato de propilo, entre otros compuestos<sup>17</sup>. Del mismo modo, Conde *et al.*<sup>18</sup> identificaron este mismo éster en vinos blancos elaborados con variedades Gual (Albilla), Malvasía y Verdello.

De acuerdo a los resultados estadísticos, habría que considerar que los piscos tipo Mosto Verde serán siempre significativamente mayores en cuanto al contenido de propanol que los provenientes de vinos base secos recién fermentados (figura 3).



**Figura 3.** Contenido de propanol en los piscos provenientes de vinos base con diferentes niveles de fermentación.

De acuerdo con el Reglamento de la Denominación de Origen PISCO<sup>1</sup>, el propanol, entre otros alcoholes superiores, debe estar presente sin precisar exigencias de máximos y mínimos. Sin embargo, los contenidos promedio de propanol de los piscos en esta investigación, en especial los provenientes de mostos con 1,040 g/L de densidad (95,50 mg/100 mL A.A.), presentaron valores bastante altos.

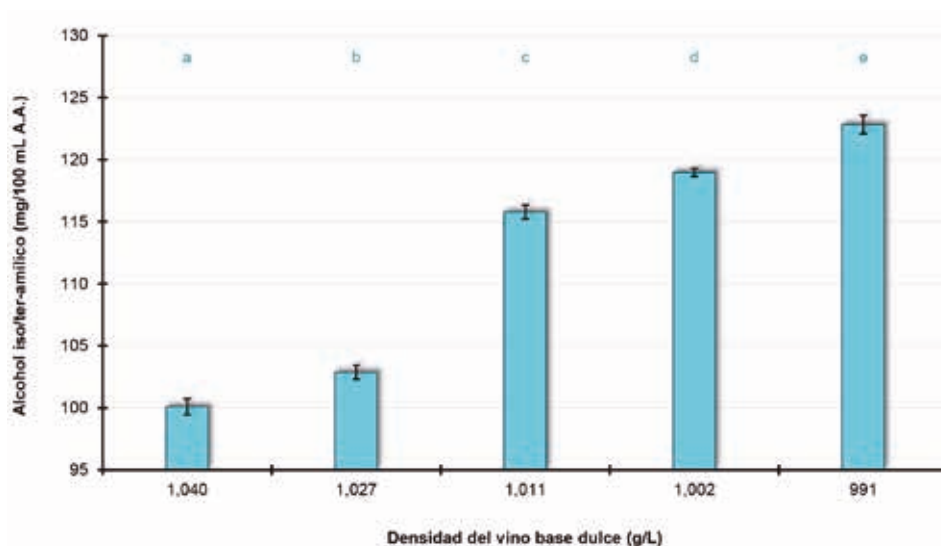
El propanol y butanol, a concentraciones normales, son inodoros pero contribuyen a las características del alcohol mismo<sup>10</sup>. Es así, que concentraciones elevadas de propanol, como las que se detectaron en el presente estudio, podrían influir significativamente en las características sensoriales finales de los piscos.

#### **Alcohol iso/ter-amílico**

Tal como se observa en la figura 4, el contenido de alcohol iso/ter-amílico tuvo mayores concentraciones en los piscos provenientes de mostos con mayores niveles de fermentación. La diferencia resultó significativa entre todos los tratamientos.

El contenido de alcohol iso/ter-amílico (mezcla de alcohol iso-amílico o metil-3-butanol-1 y alcohol ter-amílico o metil-2-butanol-2) en los piscos provenientes de mostos con diferentes niveles de fermentación, coincide con lo mencionado por Usseglio-Tomasset<sup>16</sup>, quien afirma que la formación de alcoholes superiores sucede linealmente con la producción de alcohol etílico para todos los alcoholes excepto para el propanol. Los alcoholes iso-amílico y fenilético se forman en cantidades importantes durante la fermentación de los azúcares<sup>19</sup>.

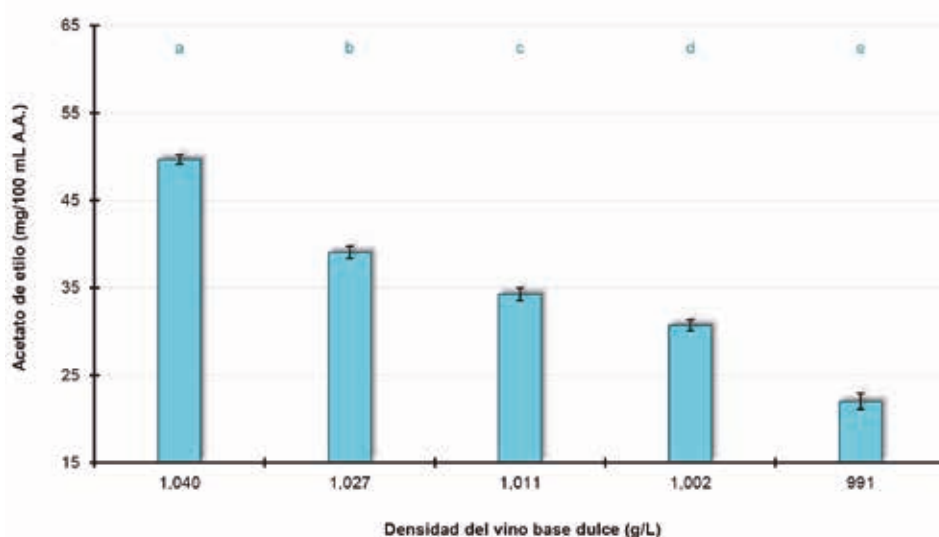
De acuerdo a los resultados estadísticos, habría que considerar que los piscos tipo Mosto Verde serán siempre significativamente menores en cuanto al contenido de alcohol iso/ter-amílico que los provenientes de vinos base secos recientemente fermentados (figura 4).



**Figura 4.** Contenido de alcohol iso/ter-amílico en los piscos provenientes de vinos base con diferentes niveles de fermentación.

### Acetato de etilo

Tal como se observa en la figura 5, el contenido de acetato de etilo tuvo menores concentraciones en los piscos provenientes de mostos con mayores niveles de fermentación. La diferencia resultó significativa entre todos los tratamientos.



**Figura 5.** Contenido de acetato de etilo en los piscos provenientes de vinos base con diferentes niveles de fermentación.

Debido a las menores concentraciones de ácido acético en los piscos provenientes de vinos base con mayores niveles de fermentación, las concentraciones de acetato de etilo, al disminuir uno de sus sustratos, también fueron menores. De acuerdo con Vogt<sup>20</sup>, la formación del éster acético del etanol (acetato de etilo) tiene lugar por reacción del ácido acético con el alcohol etílico. Además, según Verstrepen *et al.*<sup>21</sup>, básicamente, son dos los factores más importantes para la velocidad en la producción de los ésteres: la concentración de los sustratos involucrados y el alcohol (etanol o alcoholes superiores).

De acuerdo a los resultados estadísticos, habría que considerar que los piscos tipo Mosto Verde serán siempre significativamente mayores en cuanto al contenido de acetato de etilo que los provenientes de vinos base secos recientemente fermentados (figura 5). Estos resultados coinciden con lo expuesto por Cacho *et al.*<sup>22</sup>, quien ha observado mayores niveles en la mayoría de ésteres y acetatos en los piscos tipo Mosto Verde, en comparación con piscos puros Italia.

Los contenidos promedio de acetato de etilo de los piscos en esta investigación, se encontraron entre el mínimo y el máximo permitido por el Reglamento de la Denominación de Origen PISCO (10,0 a 280,0 mg/100 mL A.A.)<sup>1</sup>.

Aunque el acetato de etilo, cuantitativamente importante en el pisco, es considerado un componente negativo a la calidad por ser el responsable del olor a picado; las concentraciones encontradas en la mayoría de los piscos están por debajo del nivel de percepción<sup>10</sup>. Sin embargo, de acuerdo con Ribéreau-Gayon *et al.*<sup>4</sup>, el umbral de detección del acetato de etilo es cercano a 16 mg/100 mL A.A., por lo que en este caso, casi todos los valores obtenidos durante esta etapa sí afectarían negativamente el sabor y el olor del producto final.

### Acetaldehído

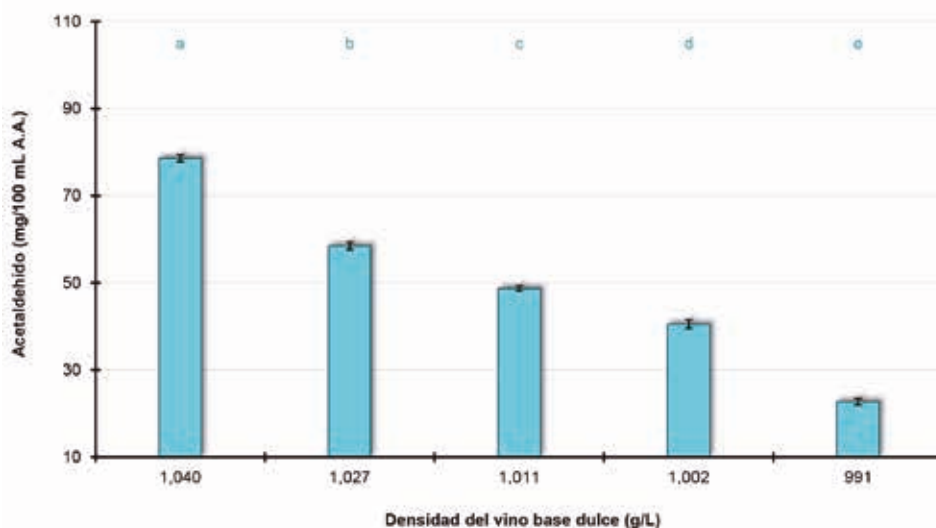
Tal como se observa en la figura 6, el contenido de acetaldehído tuvo menores concentraciones en los piscos provenientes de mostos con mayores niveles de fermentación. La diferencia resultó significativa entre todos los tratamientos.

La mayor parte de aldehídos se forman en la primera fase de la fermentación alcohólica, principalmente cuando los tratamientos prefermentativos son largos y la influencia del oxígeno es determinante<sup>23</sup>. El acetaldehído se acumula en esta etapa como consecuencia de la ausencia de la enzima alcohol deshidrogenasa de la levadura, la cual reduce el acetaldehído en alcohol<sup>23</sup> (figura 1) y debido al período de inducción que conduce a la formación de glicerina<sup>24</sup>. En efecto, habiéndose realizado el muestreo de los vinos base a partir de una densidad de 1,040 g/L (día 3 de la fermentación), no se esperaba un aumento en el contenido de acetaldehído; ya que su biosíntesis habría tenido lugar en los primeros días de la fermentación.

La disminución en la concentración de acetaldehído que se observa en los piscos provenientes de vinos con mayores niveles de fermentación, se debe al consumo que sufre este compuesto durante la fermentación alcohólica. De acuerdo con Usseglio-Tomasset<sup>16</sup>, es el acetaldehído acumulado antes de la fermentación alcohólica, el que precisamente permite el inicio de la misma (figura 1).

De acuerdo a los resultados estadísticos, habría que considerar que los piscos tipo Mosto Verde serán siempre significativamente mayores en cuanto al contenido de acetaldehído que los provenientes de vinos base secos recientemente fermentados (figura 6).

Los contenidos promedio de acetaldehído en los piscos provenientes de mostos con 1,040 g/L de densidad (78,62 mg/100 mL A.A.), se encontraron por encima del máximo permitido por el Reglamento de la Denominación de Origen PISCO (3,0 a 60,0 mg/100 mL A.A.)<sup>1</sup>.



**Figura 6.** Contenido de acetaldehído en los piscos provenientes de vinos base con diferentes niveles de fermentación.

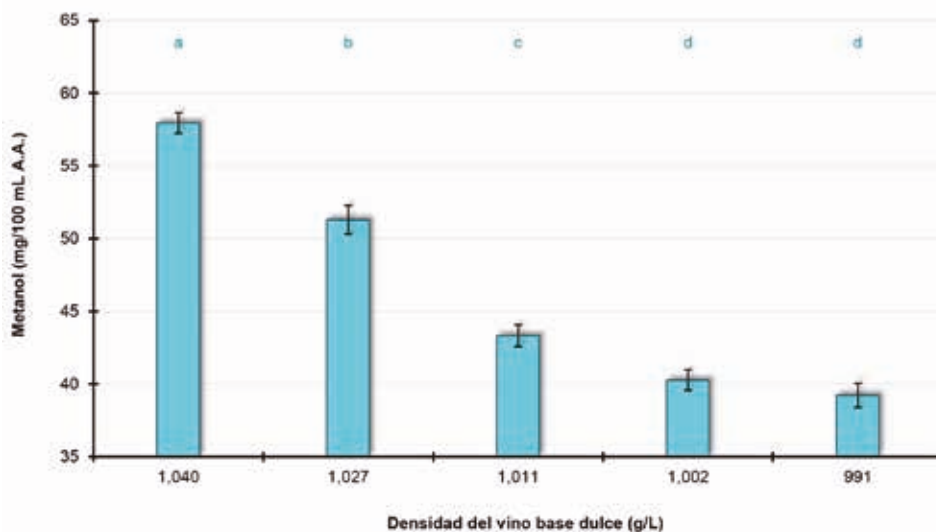
Según Suárez<sup>25</sup>, el acetaldehído forma parte del aroma normal del vino pero en altas concentraciones ejerce un efecto desfavorable, participando directamente en el gusto a “oxidado”. Es así, que concentraciones elevadas de acetaldehído como las que se detectaron en estos casos, podrían influir negativamente en las características sensoriales finales de los piscos.

### Metanol

Tal como se observa en la figura 7, el contenido de metanol tuvo menores concentraciones en los piscos provenientes de mostos con mayores niveles de fermentación. La diferencia resultó significativa entre los cuatro primeros tratamientos.

Del mismo modo que para el propanol e iso-butanol, una posible explicación de las menores concentraciones de metanol en los piscos provenientes de vinos base con mayores niveles de fermentación, sería la esterificación de este alcohol. Salinas y Alonso<sup>18</sup> han encontrado en algunos vinos blancos el acetato de metilo, entre otros compuestos.

De acuerdo a los resultados estadísticos, habría que considerar que los piscos tipo Mosto Verde con más de 1,010 g/L de densidad, serán significativamente mayores en cuanto al contenido de metanol que los provenientes de vinos base secos recientemente fermentados (figura 7).



**Figura 7.** Contenido de acetaldehído en los piscos provenientes de vinos base con diferentes niveles de fermentación.

## CONCLUSIONES

Los piscos provenientes de vinos base con menores niveles de fermentación, expresados con mayores densidades de corte (990; 1,000; 1,010; 1,025 y 1,040 g/L), presentan mayores contenidos de ácido acético (0.15, 0.16, 0.17, 0.17 y 0.18 g/L), propanol (72.15, 76.33, 82.25, 89.86 y 95.50 mg/100 mL A.A.), acetato de etilo (22.00, 30.72, 34.26, 39.06 y 49.68 mg/100 mL A.A.), acetaldehído (22.71, 40.52, 48.69, 58.51 y 78.62 mg/100 mL A.A.) y metanol (39.22, 40.27, 43.33, 51.30 y 57.95 mg/100 mL A.A.); y menores contenidos de alcohol iso/ter-amílico (122.83, 118.98, 115.78, 102.88 y 100.11 mg/100 mL A.A.).

## AGRADECIMIENTO

A “Bodegas & Viñedos Taberero S.A.C.” por las instalaciones, materia prima, insumos, equipos y materiales. A “La Molina Calidad Total Laboratorios” por los análisis de cromatografía de gases.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asociación Nacional de Productores de Pisco. Reglamento de la Denominación de Origen Pisco. Lima: INDECOPI; 2011.
2. INDECOPI. Norma Técnica Peruana: Bebidas alcohólicas. Pisco. Buenas prácticas de elaboración del pisco. NTP 212.034: 2007. Lima: INDECOPI; 2007.
3. Girard G. Bases científicas y tecnológicas de la enología. 1era edición. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.; 2004.
4. Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. Tratado de enología: química del vino. 1era edición. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur S.A.; 2003.
5. Oreglia F. Enología teórico-práctica; volumen 1. 3era edición. Buenos Aires: Ediciones Instituto Salesiano de Artes Gráficas; 1978.
6. Blouin J, Peynaud É. Enología práctica: conocimiento y elaboración del vino. 4ta edición. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 2004.
7. Hidalgo J. Tratado de enología; tomos I y II. 2da edición. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 2011.
8. Flanzy C. Enología: fundamentos científicos y tecnológicos. 1era edición. Madrid: Vicente Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa; 2000.
9. Léauté R. Distillation in alambic. Am J Enol Viticult. 1990; 41: 90-103.
10. Hatta B. Influencia de la fermentación con orujos en los componentes volátiles del pisco de uva Italia (*Vitis vinifera* L. var. Italia). □Tesis de maestría□. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2004.
11. Miličević B, Banović M, Kovačević K, Gracin, L. Impact of grape varieties on wine distillates flavour. Food Technol Biotech. 2002; 40: 227-232.
12. INDECOPI. Norma Técnica Peruana: Bebidas alcohólicas. Método de ensayo. Determinación de metanol y de congéneres en bebidas alcohólicas y alcohol etílico

- empleado en su elaboración, mediante cromatografía de gases. NTP 211.035: 2008. Lima: INDECOPI; 2008.
13. Rankine B. Manual práctico de enología. 3era edición. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.; 2000.
  14. Asencios E. Influencia de la fermentación con levaduras nativas y comerciales en las características del pisco de Uvina o Jacquez (*Vitis aestivalis-cinerea* x *Vitis vinifera*) del valle de Lunahuaná. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2007.
  15. Domenech A. Influencia de la maceración con orujos y corte de cabeza en el contenido de terpenos en piscos de la variedad Italia (*Vitis vinifera* L. var. Italia). [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2006.
  16. Usseglio-Tomasset L. Química enológica. 4ta edición. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 1998.
  17. Salinas MR, Alonso G. La destilación a presión reducida como método de separación de componentes aromáticos mayoritarios de mostos y vinos. *Rev Fac Educ Univ Albacete*. 1988; 2: 217-222.
  18. Conde JE, Rodríguez JJ, Cabrera HM, Pérez SJ, Ferreira V, Cacho JF. Compuestos volátiles en vinos blancos elaborados con las variedades Gual, Malvasía y Verdello. Paper presentado en: Jornadas Técnicas Vitivinícolas Canarias; 2003; Zaragoza-España.
  19. Bulnes L, Gisseleire A. Bases para la determinación de autenticidad del pisco chileno mediante cromatografía de gases. [Tesis de pregrado]. Santiago: Pontificia Universidad Católica de Chile; 1983.
  20. Vogt E. Fabricación de vinos. 1era edición. Zaragoza: Editorial Acribia; 1972.
  21. Verstrepren K, Derdelinckx G, Dufour J-P, Winderickx J, Thevelein J, Pretorius I, Delvaux F. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *J Biosci Bioeng*. 2003; 96: 110-118.
  22. Cacho JF, Moncayo L, Palma JC, Ferreira V, Culleré L. Informe del estudio realizado para caracterizar diferentes piscos peruanos. Aragón: Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón; 2012.
  23. Wondra M, Berovič M. Analyses of aroma contents of Chardonnay wine fermented by different yeast strains. *Food Technol Biotech*. 2001; 39: 141-148.
  24. Aleixandre JL, Álvarez MI. Tecnología enológica. 1era edición. Madrid: Editorial Síntesis; 2003.
  25. Suárez JA. Levaduras vínicas: funcionalidad y uso en bodegas. 1era edición. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 1997.

## PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA HEMORRAGINA DE ALTO PESO MOLECULAR PRESENTE EN EL VENENO DE LA SERPIENTE

### *Bothrops pictus*

Candy Bellido, Fanny Lazo, César Ortiz, Edith Rodríguez, Armando Yarlequé\*

#### RESUMEN

A partir de veneno total de la serpiente *Bothrops pictus* se ha purificado una hemorragina con actividad de metaloproteasa, usando una columna de filtración molecular sobre Sephadex G-75 y otra de intercambio aniónico sobre DEAE Sephadex A-50, equilibradas con buffer acetato de amonio 0,1M pH 5. La proteína en estudio fue obtenida al estado homogéneo con un peso molecular de 62 kDa y es de naturaleza ácida, ataca tanto a la caseína como a la gelatina y es inhibida por EDTA, 2 β-mercaptoetanol y DTT. La dosis hemorrágica mínima (DHM) de la proteína purificada fue de 0,226 μg y esta actividad fue reducida por los mismos agentes. Su pH óptimo es de 7,5 y su estabilidad térmica le permite mantener el 30,4% de su actividad luego del calentamiento a 55 °C. La hemorragina de *B. pictus* reacciona con el antiveneno botrópico polivalente, generando líneas de precipitina en pruebas de inmunodifusión doble y es neutralizada por el antiveneno usando 0,5, 1 y 2 dosis.

**Palabras clave:** Hemorragina, veneno, serpiente, metaloproteasa, caseína.

## A PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HIGH MOLECULAR WEIGHT HEMORRHAGIN PRESENT IN THE SNAKE VENOM

### *Bothrops pictus*

#### ABSTRACT

A hemorrhagin with metalloprotease activity was purified from the venom of *Bothrops pictus* snake using Sephadex G-75 molecular gel filtration and DEAE A-50 ionic exchange column. Thus a homogeneous protein entity was obtained with 62 kDa under non reducing conditions. Hemorrhagin is an acid protein, attack both casein and collagen being 0,226 μg as a DHM. Chelating agent such as EDTA as well as 2 β-mercaptoetanol and DTT produced strong inhibition both caseinolytic and hemorrhagic activities. Optimum pH was 7,5 and heating treatment reduced both activities, At 55 °C recovered activity on casein was 30,4%. On the other hand hemorrhagin is an antigenic entity showed on double immunodiffusion test and was neutralized fulling with 0,5, 1 and 2 doses of antivenom.

**Key words:** Snake, venom, *Bothrops pictus*, metalloprotease, hemorrhage, proteolytic.

\* Laboratorio de Biología Molecular-Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM. Av. Venezuela Cdra. 34 s/n. Lima 1. Perú. Teléfono: 6197000 Anexo 1528/1558. Email: ayarleque48@gmail.com



## INTRODUCCIÓN

El veneno de serpiente es una mezcla altamente compleja que contiene diversas proteínas, principalmente enzimas, así como nucleótidos, iones metálicos y pigmentos<sup>1</sup>, los cuales, en conjunto, ocasionan el cuadro de envenenamiento ofídico.

La sintomatología general del envenenamiento producido por las especies del *Bothrops* es la de originar efectos locales que incluyen edema, dolor, hemorragia, necrosis e infiltración de leucocitos<sup>2</sup>, en tanto que, los efectos sistémicos incluyen coagulopatías, hemorragia sistémica, nefrotoxicidad y cardiotoxicidad, lo cual puede conllevar a la muerte de la víctima<sup>3</sup>. Estos efectos son causados principalmente por metaloproteasas, serinoproteasas, fosfolipasas, desintegrinas, lectinas, entre otras proteínas.

Actualmente, se sabe que aproximadamente el 30% del contenido del veneno de los vipéridos son metaloproteasas, por lo que estas enzimas estarían fuertemente ligadas al proceso de envenenamiento, en particular al efecto hemorrágico así como a la degradación de proteínas tisulares y plasmáticas<sup>4</sup>. Los estudios sobre la hemorragia causada por la mordedura de vipéridos, indica que se trata de uno de los efectos más severos ya que se originan daños irreversibles en el tejido vascular, lo que posteriormente conduce a la necrosis.

En un estudio realizado por Olascoaga<sup>5</sup>, a partir del veneno completo de *B. pictus*, se determinaron diferentes actividades, tales como, actividad proteolítica, fosfolipásica, hemorrágica, edematizante, entre otras. Recientemente, Kohlhoff *et al.*<sup>6</sup>, empleando métodos proteómicos determinaron la presencia de aproximadamente ocho metaloproteasas en el veneno de esta serpiente. Sin embargo, poco se sabe aún sobre la acción hemorrágica de algunas de estas proteasas, ya que hasta la fecha no se había aislado ninguna.

Por tanto, el objetivo de la presente investigación fue explorar la presencia de metaloproteasas hemorrágicas del veneno de la serpiente peruana *Bothrops pictus* y caracterizar la de mayor actividad hemorrágica desde el punto de vista bioquímico y biológico.

## PARTE EXPERIMENTAL

1. **Veneno y antiveneno.-** Fue obtenido al estado liofilizado de especímenes adultos de *Bothrops pictus*, procedentes de la localidad de Canta (Lima), mantenidos en cautiverio en el Serpentario "Oswaldo Meneses" de la UNMSM.  
El antiveneno usado fue antibotrópico comercial (INS) Lote N0. 00300078.
2. **Cuantificación de proteínas.-** Se calculó midiendo espectrofotométricamente la absorbancia a 280 nm<sup>7</sup>, y por el método de Lowry *et al.*, 1951<sup>8</sup>, modificado por Loayza *et al.*, 1985<sup>9</sup> empleando albúmina sérica bovina como proteína estándar y midiendo la reacción a 660 nm.
3. **Actividad proteolítica y hemorrágica.-** La actividad proteolítica fue medida sobre caseína al 1%, siguiendo la técnica de Takahashi y Osaka, 1970<sup>10</sup>. Adicionalmente, esta

actividad fue evaluada en zimogramas de geles de acrilamida-gelatina, verificándose la banda de hidrólisis en los geles (Antunes, *et al.*, 2010<sup>11</sup>).

La actividad hemorrágica fue estimada por el método de Kondo *et al.*, 1960<sup>12</sup> modificado por Isla, *et al.*, 2003<sup>13</sup>, en el cual se determina el área hemorrágica en piel de ratón albino cepa Balb c, luego de dos horas de la inoculación. La dosis hemorrágica mínima (DHM) corresponde a la cantidad de proteína que origina un área hemorrágica de 10 mm de diámetro.

4. **Purificación de la metaloproteasa y peso molecular.**- 50 mg de veneno de *Bothrops pictus* disueltos en buffer acetato de amonio 0,1 M pH 5 y aplicados a una columna de filtración molecular sobre Sephadex G-75 usando el mismo buffer. Las fracciones con actividad proteolítica fueron aplicadas luego a una columna de intercambio aniónico sobre DEAE Sephadex A-50 equilibrada con el mismo buffer y eluída con una gradiente lineal de NaCl 0 - 0,3M. En la fracción obtenida se midió la actividad sobre caseína y la acción hemorrágica.

La fracción purificada fue evaluada por el método de Laemmli *et al.*, 1970<sup>14</sup>, mediante electroforesis por PAGE-SDS en condiciones no reductoras, usando una cámara vertical Techware (Sigma) a un voltaje constante de 100 V por una hora. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie 0,05% y se emplearon proteínas, marcadoras de peso molecular en el rango de 7 a 240 kDa.

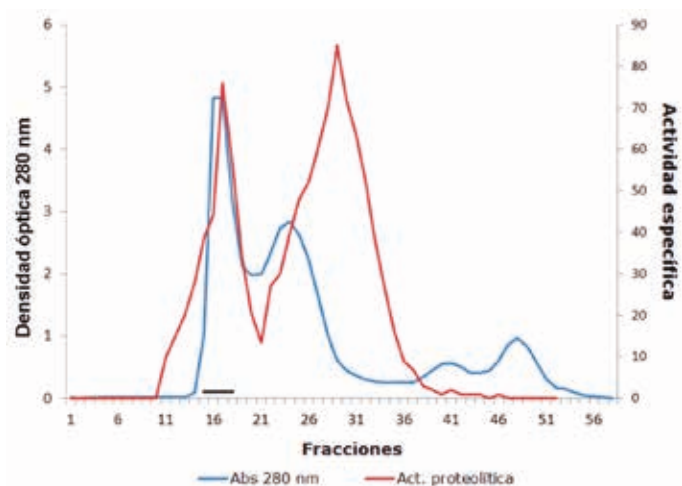
5. **Inhibidores proteolíticos.**- Se mezclaron 100  $\mu$ L de la proteína en estudio y 100  $\mu$ L del agente inhibidor a concentraciones finales de 5 y 10 mM. El agente quelante empleado fue EDTA (Ácido etilen diamino tetra acético) y los agentes reductores fueron: 2 mercaptoetanol y DTT (Ditiotreitol). Luego de 10 minutos de preincubación, se midió la actividad proteolítica sobre caseína.
6. **Determinación del pH óptimo y termoestabilidad.**- Se calculó utilizando buffer Tris HCl 0,2 M en un rango de pH de 7,0 a 9,0, usando caseína como sustrato. Asimismo, la estabilidad térmica fue medida a diferentes temperaturas en el rango de 37 a 75 °C.
7. **Antigenicidad y neutralización.**- Se realizó por el método de inmunodifusión de Ouchterlony y Nilsson, 1978<sup>15</sup>, usando placas de agarosa al 1% conteniendo la fracción proteolítica y el antiveneno y visualizando la línea de precipitina luego de la coloración con azul brillante de Coomassie al 0,05%.

En cuanto a la neutralización de la actividad proteolítica-hemorrágica fue medida usando mezclas enzima-antiveneno (0,5, 1 y 2 dosis), de acuerdo con la metodología descrita por Yarlequé *et al.*, 2008<sup>16</sup>.

## RESULTADOS

### 1. Purificación de la metaloproteasa hemorrágica

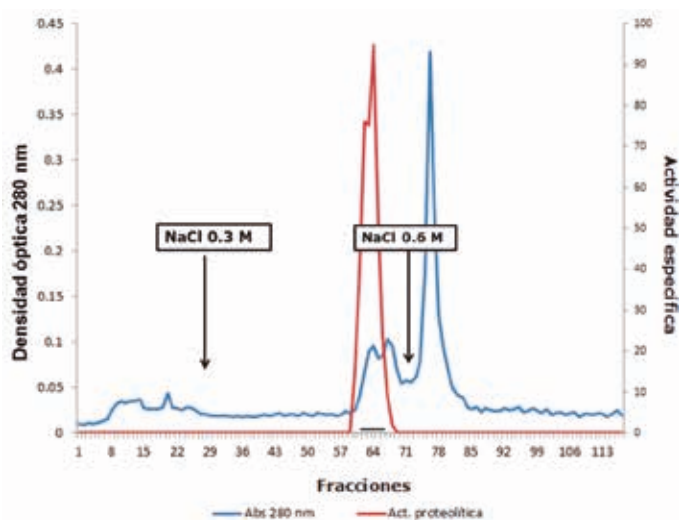
El primer paso de purificación empleando una columna de filtración molecular sobre Sephadex G-75, reveló cuatro picos de proteínas (figura 1); coincidiendo el primer pico con la actividad proteolítica.



**Figura 1.** Primer paso de purificación empleando cromatografía de filtración molecular sobre Sephadex G-75.

El segundo paso usando una columna de intercambio aniónico sobre DEAE-Sephadex A-50 dio lugar a la separación de la fracción proteolítica- hemorrágica al aplicar NaCl 0,3 M (figura 2).

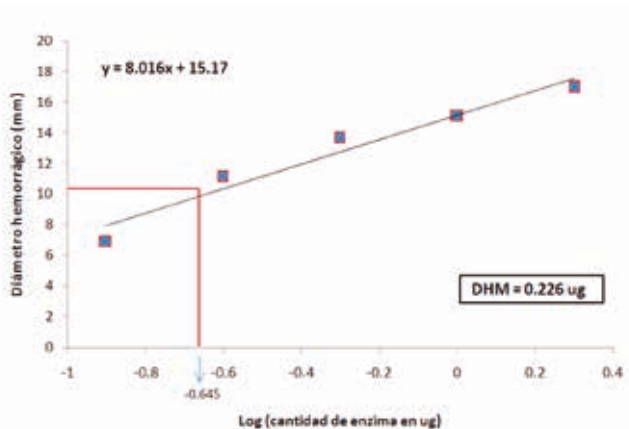
El análisis electroforético mostró una sola banda proteica con un peso molecular de 62 kDa en condiciones no reductoras, por lo que se deduce que se trata de una hemorragina de alto peso molecular.



**Figura 2.** Segundo paso de purificación empleando cromatografía de intercambio aniónico sobre DEAE Sephadex A-50.

## 2. Actividades proteolítica y hemorrágica

El análisis de la actividad sobre caseína dio un valor de 74,1 U/mg de proteína en tanto que, la actividad sobre gelatina se verificó por la hidrólisis en geles de poliácridamida, encontrándose una banda de digestión de 62 kDa que coincidía con el peso de la enzima purificada. Asimismo, la actividad hemorrágica fue estimada en 0,226  $\mu\text{g}$  lo que corresponde a una DHM. Este valor es 2,4 veces mayor que la DHM del veneno total (figura 3).



**Figura 3.** Determinación de la dosis hemorrágica mínima (DHM) de la metaloproteasa hemorrágica aislada del veneno de *Bothrops pictus*

## 3. Inhibidores

Los ensayos con EDTA, 2 $\beta$ - mercaptoetanol y DTT a la concentración de 5 mM, redujeron la actividad caseinolítica a 45,29, 67,4 y 69,2%, respectivamente, mientras que a 10 mM los valores fueron 21, 32,2 y 32,5%, respectivamente. De modo paralelo se observó una marcada reducción del efecto hemorrágico luego del tratamiento con estos agentes (tabla 1).

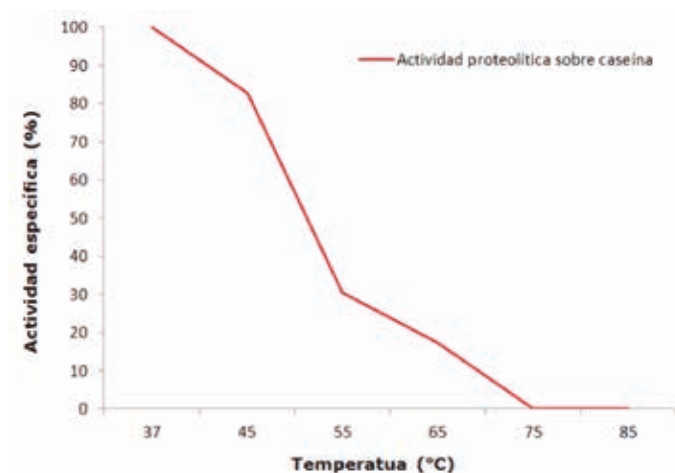
**Tabla 1.** Efecto de agentes inhibidores sobre la actividad proteolítica y acción hemorrágica.

AGENTE	mM	ACTIVIDAD	
		CASEINOLÍTICA (%)	HEMORRÁGICA*
CONTROL	---	100	+++
EDTA	5	45,29	++
	10	21,00	-
2 $\beta$ -mercaptoetanol	5	67,4	++
	10	32,2	+
DTT	5	69,2	++
	10	32,5	+

\*Hemorrágica: DHM= 0,226  $\mu\text{g}$

#### 4. pH óptimo y termoestabilidad

La actividad caseinolítica se registró en el rango de pH 7 a 9, con un valor máximo a pH 7,5. Asimismo, el tratamiento a temperaturas en el rango de 37 a 75 °C dio lugar a una progresiva pérdida de la actividad enzimática y hemorrágica; de manera que a 55 °C sólo se registró el 30,4% de la actividad inicial y una pobre acción hemorrágica. A 75 °C no se registró ni actividad caseinolítica ni acción hemorrágica (figura 4).



**Figura 4.** Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de la metaloproteasa aislada del veneno de *Bothrops pictus*.

#### 5. Antigenicidad y neutralización

La hemorragina de *B. pictus* mostró su reactividad antigénica al formar una línea de precipitina con el antiveneno botrópico polivalente en ensayos de inmunodifusión. Asimismo, la preincubación de la proteína en estudio con el equivalente de 0,5, 1 y 2 dosis del antiveneno botrópico comercial generó una total neutralización tanto de su actividad enzimática como hemorrágica.

### DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta la actual clasificación de las metaloproteasas ofídicas, de acuerdo a la organización de sus dominios, ellas pertenecen a las clases PI, PII y PIII. La habilidad para producir hemorragia durante el proceso de envenenamiento es atribuida a las tres clases, sin embargo, la clase PIII es la que presenta mayor actividad hemorrágica<sup>2</sup>.

El método de purificación usado (figuras 1 y 2) señala que la principal hemorragina de este veneno ha sido obtenida al estado homogéneo con un peso molecular de 62 kDa; este valor corresponde a proteínas de alto peso molecular que, en el caso de las metaloproteasas son de la Clase P-III; es decir hemorraginas con actividad proteolítica.

Varias metaloproteasas de la clase PIII han sido purificadas, y una de las más estudiadas es la aislada de *Bothrops jararaca*, que tiene un peso molecular de 52 kDa determinado por PAGE-SDS.

En el 2012, Kohlhoff, *et al.*<sup>6</sup> realizaron un estudio proteómico sobre tres especies del género *Bothrops* que habitan en el Perú, *B. atrox*, *B. barnetti* y *B. pictus*; en esta última se encontraron ocho metaloproteasas y se les determinó su masa molecular. Entre las metaloproteasas encontradas en este veneno se muestran dos con pesos moleculares de 60 y otra de 65 kDa por electroforesis en PAGE-SDS, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, una de las cuales correspondería a la enzima purificada en este estudio.

En la especie *B. atrox*, se han aislado metaloproteasas de peso molecular bajo<sup>17</sup> y alto<sup>18</sup>, que corresponderían a las clases PI y PIII, respectivamente. En *B. pictus*, previamente se había encontrado una metaloproteasa con un peso molecular de 50 kDa bajo condiciones reductoras y no reductoras, por lo que se trata de una enzima unicitenaria, no hemorrágica<sup>19</sup>.

La actividad proteolítica de la enzima purificada fue evaluada por dos métodos conocidos: la actividad caseinolítica y la zimografía, que emplea a la gelatina como sustrato. En la actividad caseinolítica se mide los productos ácido solubles originados por la enzima y con esta técnica se han identificado varias proteasas: *Lachesis muta*<sup>20</sup>, *Bothrops atrox*<sup>17</sup>, *B. brazili*<sup>21</sup>, *B. pictus*<sup>19</sup>, *Trimeresurus flavoviridis*<sup>10</sup>. A su vez, la zimografía sobre gelatina es un método que mide la proteólisis del colágeno, debido a que la gelatina se produce a partir de su desnaturalización, lo cual se encontraría altamente relacionada con la degradación de la matriz extracelular.

Nuestros resultados muestran actividad proteolítica sobre gelatina, en donde se pudo observar la degradación de la gelatina obtenida por la enzima purificada y que también se observó en el veneno crudo.

En las metaloproteasas se ha evidenciado la presencia de un “*binding pocket*” en el dominio catalítico altamente flexible, lo cual permite que estas enzimas muestren una amplia especificidad de sustrato<sup>4</sup>). En otras palabras, se puede emplear una variedad de sustratos, siendo la caseína (proteína genérica) y la gelatina (proteína específica derivada del colágeno) muy eficientes para evaluar esta actividad.

En el presente trabajo se pudo obtener una enzima con alta acción hemorrágica debido a que se trataría de una metaloproteasa de la clase PIII. Por otro lado, se han podido aislar proteasas hemorrágicas de las serpientes *Bothrops atrox*, *B. jararacá*, *Crotralus atrox*, *B. jararacussu*<sup>22</sup>, entre otras, y esa capacidad hemorrágica se ha atribuido tanto a los dominios catalíticos como a los no catalíticos. La existencia de actividad proteolítica no demarca una acción hemorrágica correlativa, esto se puede observar en la presente enzima purificada que tiene actividad proteolítica baja, sin embargo, muestra actividad hemorrágica mayor en comparación con la enzima aislada por Cortez<sup>19</sup>.

La DHM de la metaloproteasa purificada fue de 0,226  $\mu\text{g}$ , que representa 2,4 veces más que en el veneno crudo de *B. pictus* cuyo DHM fue de 0,535  $\mu\text{g}$ . Asimismo, se ha encontrado que la metaloproteasa aislada de *B. jararacussu* tiene un DHM de 4  $\mu\text{g}$ <sup>(22)</sup> y la de *B. brazili*, un DHM de 6  $\mu\text{g}$ <sup>13</sup>.

La temperatura es un factor importante para que una enzima mantenga su actividad, ya que al incrementarla, la enzima cambia su conformación. La composición aminoacídica de la proteína también es determinante en la estabilización de la enzima a altas temperaturas. Es así que, los aminoácidos hidrófobos dan mayor estabilidad a la enzima a diferencia de los aminoácidos hidrófilos. Además, cuando menor peso molecular muestre una proteína y mayor sea la cantidad de enlaces disulfuro, la proteína es más termoestable.

En cuanto a la estabilidad térmica de la proteína en estudio, se observó que su mayor actividad se encuentra a los 37 °C y que a 55 °C aún mantiene el 30% de actividad remanente (figura 4). Habiéndose observado un pH óptimo de 7,5, esto sugiere que la enzima se encuentra en su máxima actividad a pH sanguíneo, degradando eficientemente diversas proteínas circulatorias.

Por otro lado, la enzima del presente estudio mostró una disminución cercana al 80% empleando el agente quelante EDTA que es el principal inhibidor de la actividad enzimática de metaloproteasas ya que retira de modo irreversible los iones divalentes zinc o calcio, que forman parte de la estructura proteica. En cambio, agentes reductores como el 2 $\beta$ -mercaptoetanol y el DTT causan inhibición por acción a nivel de los residuos de cisteína que forman parte de los puentes disulfuro, por lo que se deduce que nuestra proteína en estudio contiene más de un enlace de este tipo.

Por último, es interesante señalar que la proteasa hemorrágica aislada es fuertemente antigénica ya que reconoce al antiveneno botrópico comercial y a su vez es totalmente neutralizada por el antiveneno aun a dosis bajas, lo que asegura la eficiencia de este producto en un caso de envenenamiento por esta serpiente.

## CONCLUSIONES

La proteasa hemorrágica, aislada del veneno de *Bothrops pictus*, es una metaloenzima, sujeta al efecto de agentes reductores debido a la probable presencia de puentes S-S. Estas proteínas no sólo son de utilidad para la investigación del envenenamiento sino como herramientas en el análisis de procesos biológicos diversos como la agregación plaquetaria y la apoptosis.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores de la presente investigación agradecen al Vicerrectorado de Investigación de la UNMSM, por el apoyo financiero brindado para la ejecución de este trabajo. Uno de los

autores (C. Bellido) obtuvo su título profesional de Bióloga Biotecnóloga Genetista con parte de esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Koh D, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63(24): 3030-3041.
2. Fox J, Serrano S. Snake Venom Metalloproteinases. En: MacKessy, Stephen. *Handbook of Venoms and toxins of reptils.* Boca Raton: CRC Press; 2010. p. 95-113
3. Gutiérrez J, Rucavado A, Escalante T. Snake Venom Metalloproteinases: Biological Roles and Participation in the Pathophysiology of Envenomation. En: Mackessy, Stephen. *Handbook of Venoms and toxins of reptiles.* Boca Raton: CRC Press; 2010. p. 115-138.
4. Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1824: 164–176.
5. Olascoaga M. Estudio del veneno de *Bothrops pictus*. Bioquímica, toxicidad, neutralización y efectos biológicos. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1987
6. Kohlhoff M, Borges, Yarlequé A, Cabezas C, Richardson M, Sanchez E. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *Bothrops pictus*. *J Proteomics.* 2012; 75(7): 2181-95.
7. Warburg O, Christian W. Isolation ADN crystallization of the glycolytic enzyme enolase. *Biochem Z.* 1941; 31: 384-421.
8. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biochem.* 1951; 193: 165-275.
9. Loayza S, Morante Y, Campos S, Yarlequé A. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Bol Soc Quím Perú.* 1985; 52(3):151-63.
10. Takahashi T, Ohsaka A. Purification and characterization of a proteinase in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Complete separation of the enzyme from hemorrhagic activity. *Biochim Biophys Acta.* 1970; 198(2): 293-307.
11. Antunes T, Yamashita K, Barbaro K, Saiki M, Santoro M. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon;* 2010; 56: 1443-1458.
12. Kondo H, Kondo S, Ikesawa M, Muta R, Ohsaka, A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn J Med Sci Biol.* 1960; 13: 43.
13. Isla M, Málaga O, Yarlequé A. Características bioquímicas y acción biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili*. *An Fac med.* 2003; 64(3): 159-166.
14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 226:680-684.



15. Ouchterlony O, Nilsson L. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Handbook of immunological methods, Vol. 1: *Immunochemistry*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1978.
16. Yarlequé A, Vivas D, Inga R, Rodríguez E, Sandoval G, Pessah S, Bonilla C. Acción del antiveneno botrópico polivalente sobre las actividades proteolíticas presentes en los venenos de serpientes peruanas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2008; 25(2):169-73.
17. Pantigoso C, Escobar E, Málaga O, Yarlequé A. Aislamiento y algunas propiedades de la atroxina, una proteínasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* «jergón». *Acta Cien Venez*. 1996; 47: 67-73.
18. López-Lozano J, de Sousa M, Ricart C, Chávez-Olortegui C, Sanchez E, Muniz E, Bührnheim P, Morhy L. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. *Toxicon* 2002; 40(7):997-1006.
19. Cortéz R. Aislamiento, propiedades bioquímicas y acción fibrinogenolítica de una proteasa del veneno de la serpiente *Bothrops pictus* “jergón de la costa”. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1997.
20. Rodríguez E, Yarlequé A. Aislamiento y algunas propiedades de la Proteínasa I del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. *Acta Cien Venez*. 1991; 42: 219-225.
21. Azañero A, Escobar E, Yarlequé A. Purificación de una enzima proteolítica del veneno de *Bothrops brazili* y estudio de su actividad sobre fibrinógeno. *Rev per biol*. 2000; 7(1): 67-73.
22. Sánchez E, Gabriel L, Gontijo S, Gremski L, Veiga S, Evangelista K, Eble J, Richardson M. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. *Arch Biochem Biophys*. 2007; 468: 193–204.

## **ELABORACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE UNA RED DE SENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA UNA LENGUA ELECTRÓNICA ORIENTADA AL ANÁLISIS DE LECHE**

Álvaro Á. Arrieta<sup>a</sup>, Jorge A. Díaz<sup>b</sup>, Óscar C. Fuentes<sup>b</sup>

### **RESUMEN**

En la actualidad, el uso de lenguas electrónicas ha cobrado importancia en la industria de alimentos, debido al crecimiento de la tecnología y su aprovechamiento en este sector. En el presente trabajo se muestra la elaboración y optimización de una red de sensores a base de polipirrol, el cual fue dopado con diferentes especies químicas para la modificación de una red de sensores de carbono como primera etapa de una lengua electrónica para el análisis de leche. Se analizó la estabilidad y variabilidad en la respuesta presentada por cada sensor mediante la aplicación de una técnica electroquímica conocida como voltametría cíclica, que se aplicó a través de dichos sensores a las muestras analizadas. Para el estudio de los datos se empleó un método estadístico de reconocimiento de patrones conocido como análisis de componentes principales (PCA) y para la optimización de los sensores modificados se usó el análisis de superficie de respuestas. Los resultados obtenidos demuestran que debido a la optimización de los sensores se generó una respuesta estable y con menor ruido en las señales respecto a los mismos sensores sin modificar. Se demostró la capacidad de esta red para responder diferente ante muestras de leche de diversa naturaleza.

**Palabras clave:** Lengua electrónica, sensores electroquímicos, polipirrol, leche.

## **OPTIMIZATION OF THE SYNTHESIS OF POLYPYRROLE FOR THE ELABORATION OF A NETWORK OF SENSORS ELECTROCHEMICAL (ELECTRONIC TONGUE)**

### **ABSTRACT**

Nowadays, the use of electronic tongues has gained important in the food industry, due to the growth of the technology and its use in this sector. The present work shows the elaboration and optimization of an electrochemical sensors array based on polypyrrole doped with different chemical species for the modification of sensors as the first stage of an electronic tongue for the analysis of milk. The stability and variability was analyzed in the response presented by every sensor by means of the application of a technical electrochemistry known

---

<sup>a</sup> Departamento de Biología y Química, Universidad de Sucre, Carrera 28 # 5-267 Barrio Puerta Roja, Sincelejo, Colombia, alvaroangel.arrieta@gmail.com.

<sup>b</sup> Laboratorio DANM, Grupo de desarrollo y aplicación de nuevos materiales, Universidad Pontificia Bolivariana, Carrera 6 #97A-99, Montería, Colombia.

as cyclic voltammetry that was applied across the above mentioned sensors to the analyzed samples. To study the data, patter recognition statistic method known as Principal Component Analysis (PCA) was used and for the optimization of the modified sensors was used response surface analysis. The results obtained shows that sensor optimization generate a response stable and with less noise on the same sensors without change. It was shown the capacity of this network to respond different according to milk samples.

**Key words:** Electronic tongue, electrochemical sensors, polypyrrole, milk.

## INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de productos en el sector alimenticio ha conllevado a que las empresas de esta industria se vean obligadas a buscar herramientas tecnológicas que permitan ofrecer mayor calidad en sus productos<sup>1</sup>, por lo que en la actualidad se han creado sistemas electrónicos bioinspirados como narices y lenguas electrónicas<sup>2-6</sup>. Gracias a estos dispositivos es posible discriminar diferentes tipos de bebidas<sup>7-11</sup>.

En general las lenguas electrónicas se encuentran conformadas por una red de sensores electroquímicos, que complementados con un equipo de análisis quimiométrico y herramientas de reconocimiento de patrones como el análisis de componentes principales, decodifica la información y luego clasifica las muestras.

La parte más importante de una lengua electrónica es la red de sensores, ya que es la encargada de extraer la información. Esta debe tener algunas características importantes, como selectividad cruzada, estabilidad y reproducibilidad en la señal dada, las cuales se consiguen implementando diferentes compuestos químicos a ciertas condiciones de elaboración.

En otros trabajos se han utilizado redes de sensores con sustratos constituidos por diferentes metales que han brindado resultados importantes en cuanto al reconocimiento de patrones frente a diferentes sustancias<sup>11-13</sup>. Además, se puede encontrar una serie de investigaciones en las que se usan electrodos de trabajo a base de polímeros conductores<sup>14-15</sup>, en las que se ha demostrado la excelente capacidad de estos materiales para ser utilizados como unidades sensibles. No obstante, la optimización del proceso de elaboración de los sensores, puede generar señales con características mejoradas en cuanto a la estabilidad y a la capacidad de clasificación de muestras particulares como la leche. Por lo tanto, en el presente trabajo se reporta la elaboración y optimización de una red de sensores modificados electroquímicamente con polipirrol y dopado con diferentes especies químicas, para ser aplicados en la discriminación y clasificación específica de muestras de leche.

## PARTE EXPERIMENTAL

Los reactivos empleados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich: Cloruro de sodio, trifluorometanosulfonato de litio (TFMS), ferricianuro de potasio (FCP), ácido 10-canforsulfónico (ACS), hexacianoferrato de potasio (FCN), hexafluorofosfato de potasio (HFF), ftalocianina (FC), ácido trifluoroacético (TFA), ácido clorhídrico (ACH), pirrol (Py), perclorato de litio (PL), sulfato de litio (SL), dodecilmencenosulfonato de sodio (DBS), perclorato de tetrabutil amonio (TBAP), persulfato de amonio (PSA), ácido fosfotúngstico (PWA), ácido antraquinona 1,5-disulfónico hidrato de sal disódica (AQDD) y decanosulfonato de sodio (DSA). Las disoluciones se prepararon en agua ultra pura Milli-Q. El conjunto de muestras utilizadas en el desarrollo experimental estuvo constituido por leches de marcas comerciales (entera pasteurizada, entera, semidescremada deslactosada y semidescremada). El análisis se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Los sensores usados como sustratos fueron adquiridos de DropSens; estos sensores están conformados por un electrodo de referencia de plata, un contraelectrodo de platino y un electrodo de trabajo de carbono (sustrato). La modificación de la superficie de los sensores comerciales se realizó a partir de pirrol y diferentes agentes dopantes en medio acuoso. La modificación se realizó por polimerización directa en el sustrato mediante cronoamperometría.

El proceso de optimización se realizó con diferentes dopantes y a diferentes condiciones experimentales: tiempos de polimerización de (50, 100 y 300 s), concentración de dopante de (0,05; 0,10 y 0,30 mol L<sup>-1</sup>) y concentración de pirrol de (0,10; 0,20 y 0,40 mol L<sup>-1</sup>). A los sensores se le aplicó 30 ciclos voltamétricos en una muestra de leche semidescremada para medir la pérdida de intensidad de la señal y medir su estabilidad, que luego alimentó el análisis de superficie de respuesta. Por otra parte, para obtener los valores de corriente, en el caso del análisis de componentes principales, se efectuaron 10 ciclos para estabilizar la respuesta del sensor antes de realizar cada análisis, el cual fue realizado siete veces (7 réplicas).

Las medidas electroquímicas se realizaron mediante el registro de voltamogramas con los sensores modificados sobre cada una de las muestras de leche. Estas medidas se obtuvieron aplicando un rango de potencial de -1,0 a 0,5 V y una velocidad de barrido de 0,1 V s<sup>-1</sup>.

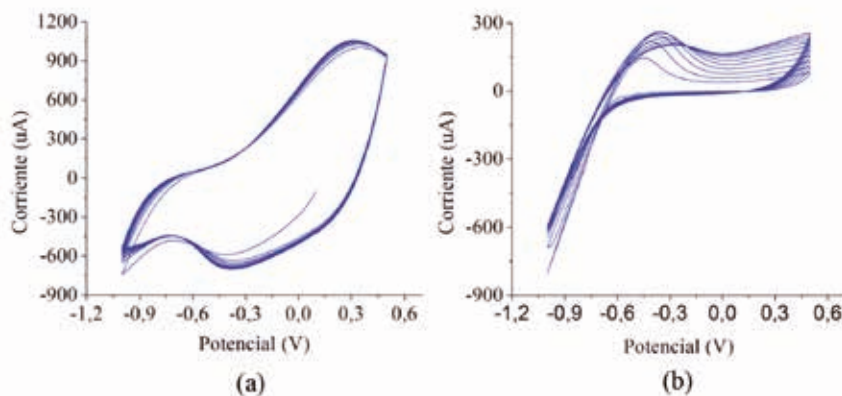
Los análisis estadísticos realizados se basaron en análisis de superficie de respuesta y el análisis de componentes principales. Para el análisis de superficie de respuesta se usó el software Statgraphics Centurion XVI, en donde se estudió las condiciones de modificación de los sensores con pirrol mediante el uso de gráficas de superficies y la aplicación de un diseño factorial de 3<sup>3</sup>. Las gráficas de superficie de respuesta se construyeron con los valores del porcentaje de la caída de intensidad de las señales, lo que es evidencia de la estabilidad de las señales y con cada una de las variantes de los niveles de concentración y tiempo.

El análisis de componentes principales se realizó en Statistica 7,0, este análisis se llevó a cabo tomando como entrada los valores de corriente de las señales voltamétricas sin ningún tipo de pre-tratamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estudios preliminares de la estabilidad de la señal en relación a las especies dopantes

Antes de iniciar el proceso de optimización de la elaboración de los sensores, se estudiaron la respuesta de los sensores modificados con diferentes dopantes, para establecer una serie de dopantes que generen sensores estables. Los dopantes estudiados fueron: TFMS, FCP, ACS, FCN, HFF, FC, TFA, ACH, PL, SL, DBS, TBAP, PSA, PWA, AQDD y DSA. En esta etapa, donde aún no se tenían optimizadas las condiciones de elaboración, se utilizaron tiempos de polimerización de 50 s, y concentración de pirrol y dopante de 0,1 y 0,5 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente y cronoamperometría a 0,8 V. Los resultados mostraron que la estabilidad depende en gran medida del agente dopante empleado. Adicionalmente, se obtuvieron diferentes valores de pérdida de intensidad para las señales voltamétricas extraídas por cada uno de los sensores modificados, mediante la aplicación de 30 ciclos voltamétricos frente a una solución de cloruro de sodio 0,1 mol L<sup>-1</sup>. En la figura 1 se presentan las respuestas de los sensores de polipirrol dopados con perclorato de litio y ácido 10-canforsulfónico. Se puede observar una amplia diferencia en la estabilidad de las señales, con valores de pérdida de estabilidad 1,20% para PPy/PL y de 20,98% para PPy/ACS.



**Figura 1.** Respuestas voltamétricas frente a una solución de NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> con sensores: a) PPy/PL y b) PPy/ACS.

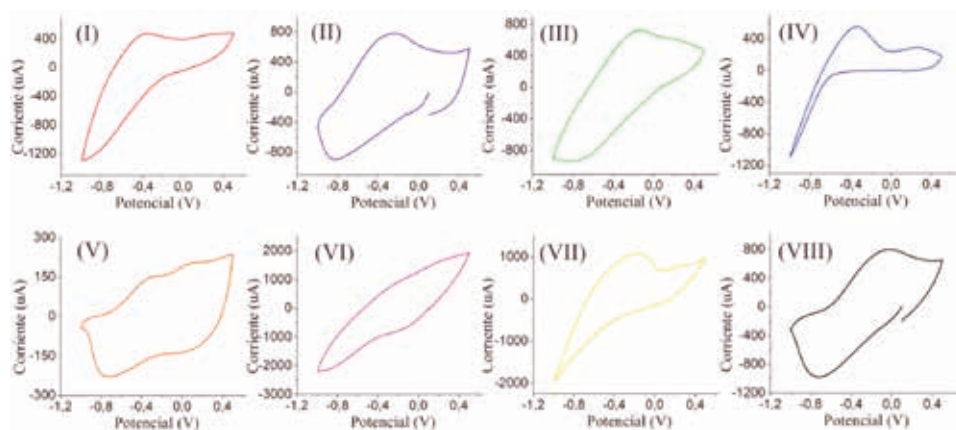
Este comportamiento puede ser asociado a las interacciones que pueden establecerse entre las especies dopantes y las cadenas de polipirrol que, en el caso de ser fuertes, pueden generar señales más estables debido a que no se da pérdida de dopante por atrapamiento electrostático (debido a las cargas) o físico (debido al tamaño de las especies).

Los dopantes con valores de pérdida de intensidad menores a 5,00%, fueron considerados con buena estabilidad (PL, SL, DBS, TBAP, PSA, PWA, AQDD y DSA), los de mayor pérdida de intensidad fueron descartados (ACS, TFMS, FCP, FCN, HFF, FC, TFA, y ACH).

## Evaluación de las respuestas voltamétricas frente a muestras de leche

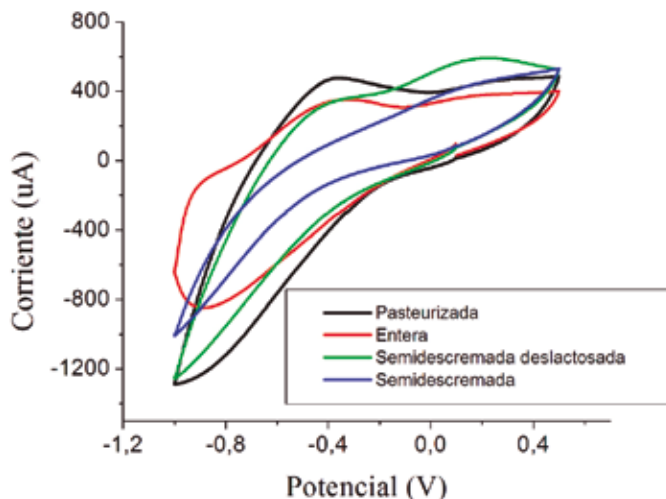
Una vez evaluado el comportamiento de los diferentes dopantes y su estabilidad, la red de sensores constituida por los dopantes con mayor estabilidad fueron expuestos a muestras de leche para estudiar su respuesta voltamétrica y establecer si se presentan procesos redox en sus señales que puedan dar información sobre las particularidades de las muestras debido a que estos procesos son el reflejo de las interacciones del material electroactivo (polipirrol) y el medio analizado en toda su complejidad química (muestra de leche).

En primera instancia se determinó la selectividad cruzada, que consiste en el hecho de que cada sensor responda de manera distinta frente a muestras con diferentes propiedades organolépticas y químicas, y que frente a una misma muestra de leche cada sensor muestre un comportamiento distinto, lo que evidencia que cada uno aporta información importante en la discriminación y clasificación de las muestras y que la red en conjunto puede ser capaz de diferenciar cada muestra. Para llevar a cabo este estudio se expuso la red de sensores a una muestra de leche pasteurizada. En la figura 2a, se presenta la respuesta obtenida y se observa que cada sensor registra una señal distinta, lo que nos indica que cada sensor está dando información sobre la muestra analizada.



**Figura 2.** Señales voltamétricas extraídas de una muestra de leche pasteurizada: I) PPy/PL, II) PPy/AQDD, III) PPy/SL, III), IV) PPy/ DBS, V) PPy/ TBAP, VI) PPy/ PSA, VII) PPy/DSA y VIII) PPy/ PWA.

Por otra parte, se expuso un sensor modificado con polipirrol y perclorato de litio sobre diferentes muestra de leche. Se encontró que el sensor respondió de manera distinta frente a cada una de las muestras, lo que en definitiva permite a la red discriminar o clasificar muestras debido a su sensibilidad cruzada. Los perfiles voltamétricos extraídos por el sensor se ilustra en la figura 3.



**Figura 3.** Voltamogramas registrados por un sensor a base de PPy/PL sumergido en leche de diferente naturaleza.

En la tabla 1 se reporta los valores de los potenciales para los barridos anódicos y catódicos de los procesos óxido-reducción dispuestos en la figura 2. Cada uno de los potenciales demuestra la diversidad de información dada por la técnica de voltametría, además del uso de compuestos electroactivos como el pirrol y algunos iones dopantes.

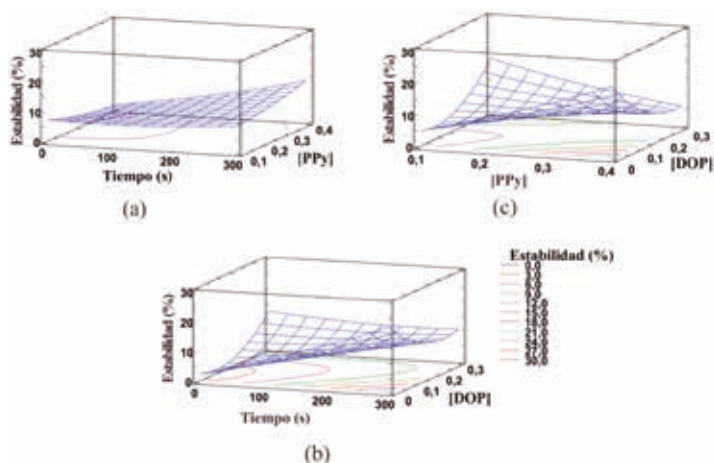
**Tabla 1.** Potenciales debido a la capacidad electroactiva de la película PPy-Dopante Vs sustancia (leche).

Voltamogramas	$E_{1/2}$ Pico anódico (V)	$E_{1/2}$ Pico catódico (V)
I	-0,42	-----
II	-0,22	-0,82
III	-0,17	-0,77
IV	-0,35	-----
V	-0,39 y 0,18	-0,78 y 0,20
VI	-----	-0,09
VII	-0,15	-----
VIII	0,09	-0,75

### Optimización del proceso de elaboración de la red de sensores

Al comprobar la sensibilidad cruzada de la red de sensores, podemos inferir que ésta proporciona información que puede permitir la clasificación de muestras de leche. Sin embargo, para poder conseguir una mejor sensibilidad cruzada y una mejor estabilidad de los sensores, es necesario que el proceso de elaboración sea optimizado frente a lo que será su analito o muestras a analizar.

En este sentido las gráficas de superficie de respuesta y las curvas de nivel permitieron analizar los efectos del tiempo de polimerización, concentración de pirrol y concentración del dopante sobre la estabilidad de las señales, la cual se utilizó como variable de salida. Lo anterior se realizó con la finalidad de obtener los valores óptimos de los niveles para cada uno de los factores utilizados en la elaboración de la red de sensores y descritos en la parte experimental.



**Figura 4.** Superficies de respuesta y curvas de nivel para la estabilidad de las señales voltamétricas en función de la variación de los niveles de: a) tiempo Vs [PPy], b) tiempo Vs [Dop], c) [PPy] Vs [Dop] para las 27 combinaciones posibles.

En las gráficas de superficie de respuesta, que se muestran en la figura 4, donde la altura de las superficies representa los valores del porcentaje de estabilidad, que se determinaron por los porcentajes en la pérdida de la intensidad de las señales de los sensores; por tanto, valores más bajos de pérdida de intensidad representan mayor estabilidad. Este modelo de superficie de respuesta indica claramente el comportamiento de las variables en el proceso, demostrando así la proporcionalidad de los factores, es decir que al aumentar dos de los factores se puede afectar considerablemente la estabilidad de los sensores.

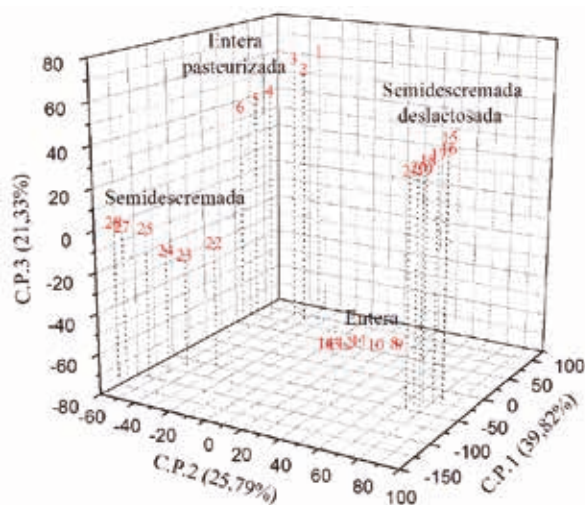
También, podemos observar que la concentración de dopante presenta un óptimo de estabilidad a valores intermedios próximos a  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . La concentración de pirrol para valores extremos presenta una tendencia a incrementar la inestabilidad de los sensores, y en este sentido la inestabilidad se ve aumentada por el incremento en el tiempo y contrarrestado por alta o baja concentración de dopante utilizado. En cuanto al tiempo, la tendencia exhibe mayor inestabilidad al exponer la celda a un tiempo de reacción prolongado. También, se puede observar que la zona más baja de la superficie de respuestas presentan los valores más adecuados para llevar a cabo la elaboración de los sensores, los cuales corresponden a tiempos de polimerización entre 100 y 150 s, concentración de pirrol comprendida entre  $0,18$  y  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  y una concentración de dopante entre  $0,10$  y  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ . Estos valores pueden confirmarse observando los mapas de contorno, donde la región cercana al valor óptimo es



apreciable con el cambio en la curvatura de las líneas de contorno, lo que específicamente se presenta en la línea de color rosado de las curvas de nivel.

### Evaluación de la capacidad de discriminación de la red de sensores optimizada frente a muestras de leche comercial

La capacidad de la lengua electrónica para discriminar y clasificar diferentes tipos de leche comercial fue determinada mediante el análisis de cuatro muestras de leche comercial. Una vez realizada las medidas, se hizo el tratamiento de datos mediante un análisis de componentes principales, la cual se puede observar en la figura 5.



**Figura 4.** Representación de las tres primeras componentes principales de los valores obtenidos en muestras de diferentes tipos de leche.

Los resultados reportados en la figura 5, donde se muestran las tres primeras componentes principales, las que conjuntamente recogen un 86,84% de información presente en las muestras. La primera componente contiene la mayor cantidad de información con un 39,82%, la segunda componente contiene el 25,79% y la tercera 21,33%. Se puede apreciar claramente, una buena separación de las muestras en el plano representado, lo que indica una excelente capacidad de discriminación por la red de sensores elaborada y optimizada.

## CONCLUSIONES

El uso de especies químicas electroactivas para la modificación de los sensores, permitió obtener señales estables debido a las interacciones dopante/PPy. Gracias a este comportamiento se incentiva la búsqueda de nuevos agentes modificadores con características que faciliten la obtención de repuestas electroquímicas variadas para la fabricación de lenguas electrónicas más eficientes.

Mediante el análisis de superficie de respuesta se encontró una combinación óptima de los niveles en los valores experimentados, lo que permitió establecer para el proceso de modificación estudiado sensores que aportaran respuestas voltamétricas estables, empleando valores cercanos a la zona de un tiempo de 100 s, concentración del monómero de 0,2 mol L<sup>-1</sup> y concentración de dopante de 0,10 mol L<sup>-1</sup>.

La técnica de voltametría cíclica implementada en este trabajo sirve correctamente como herramienta de recolección de información, dando así respuestas ricas y estables. Por lo que trae consigo una buena clasificación y reconocimiento exitoso de las muestras de leche.

### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el soporte financiero brindado por COLCIENCIAS (contrato N°. 0401-2013) y la Universidad Pontificia Bolivariana seccional Montería.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cappozzo JC, Koutchma T, Barnes G. Chemical characterization of milk after treatment with thermal (HTST and UHT) and nonthermal (turbulent flow ultraviolet) processing technologies. *J Dairy Sci.* 2015; 98(8):5068-79.
2. Parra V, Arrieta AA, Fernández-Escudero J-A, Rodríguez-Méndez ML, De Saja JA. Electronic tongue based on chemically modified electrodes and voltammetry for the detection of adulterations in wines. *Sensors Actuat B-Chem.* 2006;118(1-2):448-53.
3. García-Martínez T, Bellincontro A, de Lerma Mde L, Peinado RA, Mauricio JC, Mencarelli F, Moreno JJ. Discrimination of sweet wines partially fermented by two osmo-ethanol-tolerant yeasts by gas chromatographic analysis and electronic nose. *Food Chem.* 2011; 127(3):1391-6.
4. Simões da Costa AM, Delgado I, Rudnitskaya A. Detection of copper, lead, cadmium and iron in wine using electronic tongue sensor system. *Talanta.* 2014;129:63-71.
5. Marković K, Major N, Smola I, Levaj B, Krbavčić IP, Hruškar M, et al. Application of electronic tongue in isotonic sports drinks characterization and differentiation during storage. *Croat J Food Sci Technol.* 2011; 3 (2): 32-38.
6. Dias LA, Peres AM, Veloso ACA, Reis FS, Vilas-Boas M, Machado AASC. An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk. *Sensors Actuat B-Chem.* 2009;136(1):209-17.
7. Moreno-Barón L, Cartas R, Merkoçi A, Alegret S, del Valle M, Leija L, et al. Application of the wavelet transform coupled with artificial neural networks for quantification purposes in a voltammetric electronic tongue. *Sensors Actuat B-Chem.* 2006;113(1):487-99.
8. Cetó X, González-Calabuig A, Capdevila J, Puig-Pujol A, del Valle M. Instrumental measurement of wine sensory descriptors using a voltammetric electronic tongue. *Sensors Actuat B-Chem.* 2015;207, Part B:1053-9.

9. Cortina-Puig M, Muñoz-Berbel X, Alonso-Lomillo MA, Muñoz-Pascual FJ, del Valle M. EIS multianalyte sensing with an automated SIA system—An electronic tongue employing the impedimetric signal. *Talanta*. 2007; 72(2):774-9.
10. Campos I, Alcañiz M, Aguado D, Barat R, Ferrer J, Gil L, et al. A voltammetric electronic tongue as tool for water quality monitoring in wastewater treatment plants. *Water Res*. 2012;46(8):2605-14.
11. Escuder-Gilabert L, Peris M. Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis. *Anal Chim Acta*. 14 de abril de 2010;665(1):15-25.
12. Novakowski W, Bertotti M, Paixão TRLC. Use of copper and gold electrodes as sensitive elements for fabrication of an electronic tongue: Discrimination of wines and whiskies. *Microchem J*. 2011;99(1):145-51.
13. Blanco CA, de la Fuente R, Caballero I, Rodríguez-Méndez ML. Beer discrimination using a portable electronic tongue based on screen-printed electrodes. *J Food Eng*. 2015;157:57-62.
14. Ha D, Sun Q, Su K, Wan H, Li H, Xu N, et al. Recent achievements in electronic tongue and bioelectronic tongue as taste sensors. *Sensors Actuat B-Chem*. 2015;207, Part B:1136-46.
15. Cetó X, Apetrei C, del Valle M, Rodríguez-Méndez ML. Evaluation of red wines antioxidant capacity by means of a voltammetric e-tongue with an optimized sensor array. *Electrochim Acta*. 2014;120:180-6.

## DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS DE RESIDUOS DE BARRIDO DE CALLES USANDO COMPOST

Lizardo Visitación Figueroa<sup>a</sup>, Freddy J. Rojas<sup>b</sup>, Víctor Meza Contreras<sup>a</sup>,  
Lisveth Flores del Pino<sup>a</sup>

### RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la degradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) provenientes de residuos de barrido de calles utilizando tratamiento aeróbico con dos tipos de compost a diferente grado de maduración. La degradación fue evaluada en mezclas al 75% de residuo de barrido de calles con compost a intervalos de 0, 28, 60, 90 y 120 días. Se logró una mayor remoción al 80% y 90% de la sumatoria de HAPs ( $\Sigma$ HAPs) en 120 días de tratamiento en compost sin y con pretratamiento anaeróbico, respectivamente; esto posiblemente influenciado por la presencia de microorganismos con capacidad de degradar materia orgánica y producir sustancias húmicas. El efecto tóxico evaluado como BaPeq se reduce en más del 66% en los 30 primeros días para las muestras con tratamiento y más de 90 días para la muestra control. El efecto ecotoxicológico evaluado sobre *Daphnia magna* y *Lactuca sativa*, nos indican que los HAPs al ser cometabolizados producen metabolitos con mayor efecto ecotoxicológico, principalmente entre los 30 y 60 días, reduciendo su efecto a más de 90 días de tratamiento.

**Palabras clave:** HAPs, compost, sustancias húmicas, residuos de barrido de calles.

## POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON DEGRADATION FROM WASTE STREET SWEEP BY COMPOST

### ABSTRACT

In this study the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) present in waste street sweeping by aerobic treatment was assessed using four different samples of compost quality. It was possible to reduce the concentration in the samples  $\Sigma$ HAPs reaching removal rates of greater than 80% within 120 days of aerobic treatment, samples of compost with anaerobic pretreatment promote further degradation of PAHs reaching higher removals than 90%, this may influenced by the presence of microorganisms capable of degrading organic matter and humic substances produce. The toxic effect evaluated as BaPeq is reduced by

---

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

<sup>b</sup> Pontificia Universidad Católica del Perú, Ingeniería Mecánica - Área Energía, Av. Universitaria 1801, San Miguel (Lima-Perú), Tel: (511) 6262000 (Anexo 4820).

over 66% in the first 30 days of treatment for waste shows similar percentages sweep streets can be achieved in more than 90 days of treatment. The ecotoxicological effects assessed on *Daphnia magna* and *Lactuca sativa*, indicate that PAH metabolites being produced cometabolizados more ecotoxicological effect mainly between 30 and 60 days, reducing its effect over 90 days of treatment.

**Key words:** PAHs, compost, humic acids residues streets.

## INTRODUCCIÓN

Los residuos de barrido de calles (RBC) tienen una alta ecotoxicidad y toxicidad, por la presencia de varias sustancias contaminantes, tales como los HAPs, estos residuos pueden ser tratados utilizando mezclas de compost, debido a que este material tiene una gran capacidad para sostener poblaciones de microorganismos capaces de degradar una variedad de contaminantes orgánicos como los HAPs mineralizándolos hasta CO<sub>2</sub> o fijándolos irreversiblemente en la matriz sólida<sup>1,2,3</sup>.

La influencia de la adición de compost sobre la degradación de los HAPs en RBC y suelos puede deberse a tres mecanismos: la adsorción de los HAPs sobre la matriz sólida, el compost como fuente de nutrientes, microorganismos asociados a la matriz orgánica de la mezcla del compost y del residuo. Estudios realizados sobre estos mecanismos han determinado que la presencia de los microorganismos de la matriz compost, residuos o suelo es el principal aporte del compost, existiendo una fase previa de adaptación<sup>2</sup>, donde el cometabolismo es el mecanismo frecuentemente utilizado para la biodegradación de los HAPs<sup>3</sup>.

Los microorganismos capaces de degradar sustancias húmicas presentes en muestras de compost maduro tienen potencial para degradar los HAPs presentes en suelos o residuos sólidos<sup>3</sup>, además la adición de compost maduro mejora significativamente la actividad microbiana del suelo, las condiciones del suelo, la disponibilidad de nutrientes, facilitando la degradación de los HAPs<sup>4</sup>.

Compost producido por la mezcla de rastrojo vegetal (paja, hojas, recortes o tallos) como fuente de carbono y excretas animales (oveja, pollo, vacunos) han probado capacidad para biodegradar HAPs y otros contaminantes orgánicos<sup>3,5</sup>.

En el Perú son limitados los trabajos realizados sobre HAPs en muestras de residuos y sus efectos, motivo por el cual nuestro objetivo para la presente investigación fue evaluar la degradación de los HAPs en RBC utilizando dos tipos de compost en dos grados de maduración, mediante la medición de la concentración individual de cada HAP, ΣHAPs, determinación del BaPeq donde se incluye el efecto carcinogénico de los 16 HAPs, y test ecotoxicológicos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Toma de muestra

Las muestras de RBC fueron tomadas de la Av. Abancay, en el Centro de Lima, durante los meses de octubre y noviembre del 2014, la recolección fue realizada de forma manual, con un suave barrido a lo largo de toda la avenida<sup>6</sup>, una hora previa al paso del personal de limpieza (23:00 horas). Las muestras fueron secadas y almacenadas a 4 °C, previo a los ensayos de degradación, las muestras de los diferentes días fueron homogenizadas.

### Caracterización fisicoquímica de las muestras de compost

Se trabajó con dos tipos de compost en dos grados de maduración: 1) compost producido por la Asociación XRunner, elaborado de aserrín y excretas, inmaduro (XI) de 6 meses y maduro (XM) de 1 año, estas muestras de compost han tenido un pretratamiento anaerobio de 20 a 30 días. 2) Compost producido por el Centro Modelo de Tratamiento de Residuos (CEMTRAR) de la UNALM elaborado de rastrojo vegetal y excretas, inmaduro (CI) de 2 meses y maduro (CM) de 4 meses, sin pretratamiento anaerobio inicial.

Los parámetros medidos para caracterizar las muestras de compost fueron el porcentaje de humedad, ceniza, perdida por ignición (PPI) y la relación carbono nitrógeno C/N<sup>7</sup>. La madurez del compost fue evaluada mediante el porcentaje de ácidos húmicos<sup>8</sup>.

### Degradación de HAPs en muestras de compost

Los RBC fueron mezclados con las muestras de compost al 75 %, se colocó 5 kg de las mezclas en un reactor tubular de 12 L a 35 °C, las muestras fueron aireadas 2 veces a la semana por rotación manual. Se tomaron submuestras de 5 g del proceso de degradación a los 0, 28, 60, 90 y 120 días, con la finalidad de medir la concentración residual de HAPs<sup>9</sup>. Las concentraciones de los diferentes HAPs, en función del tiempo, fueron evaluados utilizando una reacción de pseudo primer orden. Se estimó el tiempo de vida media de cada HAP en los RBC con y sin tratamiento con compost<sup>10</sup>.

### Análisis de HAPs

La extracción de HAPs, de las mezclas de RBC con compost, fue realizada a partir de 5 g de muestra en el equipo Ultrasonic Cleaner Modelo UC-20 de la marca Jeio Tech con una frecuencia ultrasónica de 40 KHz a escala media y 25 °C de temperatura<sup>11</sup>, por un intervalo de 10 minutos, utilizando una mezcla al 10% de éter en hexano y 2 g de sulfato de sodio anhidro<sup>12</sup>. Se purificó el extracto con una columna de 0,75 cm de radio con 2 g de silicagel 60 (30-70 mesh). Para la determinación de los HAPs se utilizó el Sistema de Cromatografía de Gases Agilent Technologies 7890A, con detector de masas 5975 C y automuestreador modelo 120, columna Zebron ZB-5MS Capilar de 30m x 0,32mm x 1,00um, gas de corrida Helio 0,6 mL/min con flujo constante.

### Efecto ecotoxicológico y toxicológico

Para la obtención del extracto de lixiviación de las submuestras tratadas se empleó el Procedimiento de Caracterización de un lixiviado por su toxicidad “Toxicity Characteristic

Leaching Procedure” (TLCP) utilizando una dilución del residuo 20:1 con un extractante a pH = 4,9<sup>13,14</sup>.

Se evaluó la ecotoxicidad de las submuestras siguiendo los lineamientos del protocolo de la EPA 600/3-88/029 para test agudos de lugares con residuos peligrosos evaluados sobre el lixiviado<sup>15</sup>. Se utilizó como organismos de prueba neonatos de *Daphnia magna* con 24 horas de nacidos, evaluando la concentración que ocasiona un efecto tóxico al 50% de la población (EC50) durante 24 horas<sup>16-18</sup>, semillas de *Lactuca sativa* evaluando el índice de germinación (Ig)<sup>17</sup>.

Los parámetros toxicológicos fueron transformados en unidades tóxicas (UT), mediante el uso de la fórmula de  $UT = \frac{C}{CE_{50}}$  donde C es la concentración del residuo máxima utilizada (en este caso 100%) y CE<sub>50</sub> es la concentración que ocasiona efecto, en el trabajo se utilizó CE50 efecto al 50% de la población<sup>18-20</sup>.

La toxicidad de las muestras tratadas y sin tratar fue determinado utilizando los Factores de Equivalencia Tóxica (FET) propuestos por Nisbet y LaGoy, siendo el BaP la sustancia de referencia más tóxica<sup>21</sup>. La Concentración Tóxica Equivalente (CTE) de la muestras RBC se determinó por la suma de los productos de la concentración de cada HAP individual determinado en un estudio anterior y su FET<sup>11,22</sup>.

### Correlación entre calidad del compost y degradación de los HAPs

Se elaboró una matriz de correlación de Pearson entre los parámetros de calidad del compost y la sumatoria de la concentración de los HAPs y BaP equivalente al final de los tratamientos, con la finalidad de observar la influencia de la calidad del compost en la eficiencia de degradación de los HAPs.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización Físicoquímica del Compost

Como se observa en la tabla 1, las muestras provenientes de CEMTRAR presentan menores valores de humedad, material orgánico como pérdida por ignición PPI, relación C/N, mayores valores de ceniza y porcentaje de ácidos húmicos (% HA) que las muestras de XRUNNER. Las muestras de CEMTRAR difieren significativamente de las muestras de XRUNNER.

**Tabla 1.** Resultados de caracterización del compost

	% Humedad	Ceniza	PPI	C/N	% HA
CM	34,15	41,5	35,08	11,97	9,9
CI	18,81	43,9	43,61	12,63	8,9
XI	80,44	3,9	79,62	14,42	4,0
XM	54,42	23,3	48,43	14,8	1,9

La producción del compost de XRUNNER, al obtenerse por varios procesos con bajo contenido de oxígeno, presenta contenidos de ácidos húmicos menores al de CEMTRAR, donde se obtiene íntegramente por procesos aeróbicos, situación similar ha sido descrita por Binner *et al.*, 2007.

### Degradación de HAPs en muestras de compost

El contenido inicial de HAPs en RBC (tabla 2) expresado como  $\Sigma$ HAPs presenta un valor de 2,7234  $\mu\text{g/g}$  y como BaPeq de 0,2824  $\mu\text{g/g}$ . Como se observa en la figura 1 en condiciones adecuadas de humedad y aireación la  $\Sigma$ HAPs en los RBC se reduce en 65% en 120 días. Las tratamientos con muestras XI y XM logran una reducción del 93,4 y 95,6%, respectivamente, mientras que con las muestras CI y CM logran una reducción del 81,3 y 85,5%, respectivamente, esta situación puede deberse a que el material de compost XI y XM proviene de procesos parcialmente anaeróbicos y al someterse a un tratamiento aeróbico promueven los microorganismos que forman sustancias húmicas<sup>8</sup>. Estos microorganismos tienen la capacidad de degradar a los HAPs de forma similar como degradan la materia orgánica para producir sustancias húmicas<sup>3</sup>, por otro lado las muestras XI y XM, al tener mayor relación C/N, están en estado incompleto de maduración. Por otro lado, se observa que entre los 30 primeros días se logra una remoción mayor al 60% de la  $\Sigma$ HAPs para todas las muestra de compost con RBC. En la muestra de solo RBC se logra el 60% de la  $\Sigma$ HAPs recién a los 90 días.

**Tabla 2.** Contenido de HAPs en muestra de RBC

HAPs	FET	Límite de Detección	Unidades	Extracto de RBC (mg/L)	RBC $\mu\text{g/g}$
NAP	0,001	0,00007	mg/L	ND	ND
ACY	0,001	0,00007	mg/L	ND	ND
ACE	0,001	0,00007	mg/L	ND	ND
FLO	0,001	0,00007	mg/L	ND	ND
PHE	0,001	0,00007	mg/L	0,0248	0,1243
ANT	0,01	0,00007	mg/L	ND	ND
FLA	0,001	0,00007	mg/L	0,0643	0,3216
PYR	0,001	0,00007	mg/L	0,1108	0,5543
BaA	0,1	0,00007	mg/L	0,0476	0,2381
CHR	0,01	0,00007	mg/L	0,0483	0,2415
BbF	0,1	0,00007	mg/L	0,0559	0,2795
BkF	0,1	0,00007	mg/L	0,0261	0,1306
BaP	1,0	0,00007	mg/L	0,0311	0,1558
IcdP	0,1	0,00007	mg/L	0,0396	0,1980
DahA	1	0,00007	mg/L	0,0151	0,0754
BghiP	0,01	0,00007	mg/L	0,0808	0,4040
$\Sigma$ HAPs				0,5447	2,7234
BaPeq				0,05648	0,2824



Naftaleno (NAP); Acenaftileno(ACY); Acenafteno (ACE); Fluoreno (FLO); Fenantreno (PHE); Antraceno (ANT); Fluoranteno (FLA); Pireno (PYR); Benz[a]antraceno (BaA); Criseno (CHR); Benzo[b]fluoranteno(BbF); Benzo[k]fluoranteno (BkF); Benzo[a]pireno (BaP); Indeno[1,2,3-cd]pireno (IcdP); Dibenzo[a,h]antraceno (DahA); Benzo[ghi]perileno (BghiP); Sumatoria de HAPs ( $\Sigma$ HAPs); Benzo[a]pireno equivalente (BaPeq)

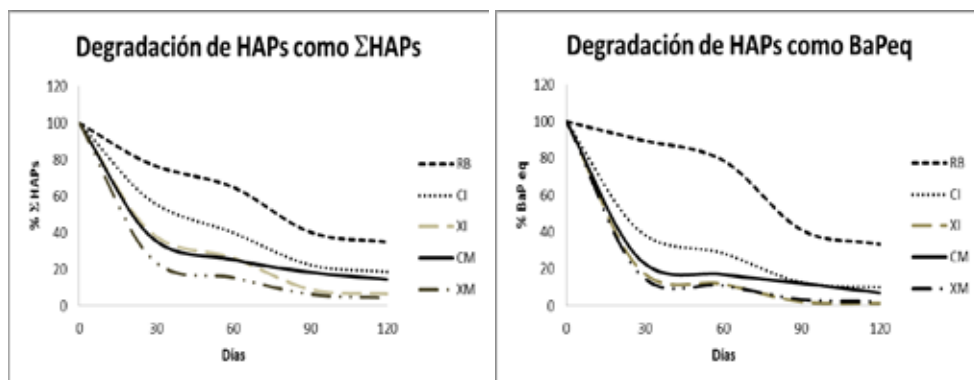


Figura 1. Degradación de HAPs como  $\Sigma$ HAPs y BaPeq

Tabla 3. Tiempo de vida media de los diferentes HAPs en residuos de barrido de calles y tratamiento con compost

PAH	t ( <sup>1</sup> / <sub>2</sub> ) días					Anillo	Promedio grupo	Literatura suelos <sup>10</sup>
	RRBB	CM	XM	CI	XI			
FTH	28	10	< 2	12	16	4	28	110 – 4745
PYR	88	34	20	32	34	4		250
BaA	22	8	< 2	17	13	4		240 – 730
CRY	69	45	26	45	33	4		87 – 5183
BbF	83	49	18	41	46	5	34	139 – 4015
BaP	50	4	< 2	10	< 2	5		151 – 5329
DahA	135	20	< 2	42	11	5		240 – 730
BghiP	181	96	44	110	46	6	75	173 – 657
IcdP	134	35	10	63	27	6		58 – 730

Como se observa en la tabla 3, sobre la biodegradabilidad de cada HAP, el tiempo de vida media promedio de los HAPs se incrementa con el número de anillos de los HAPs, No se ha detectado presencia de HAPs de 3 anillos debido a que tienen gran volatilidad y solubilidad relativa en agua cuando son biodegradados. Los HAPs de 4 anillos tienen un tiempo de vida media promedio de 28 días, estos compuestos son más hidrofóbicos, menos solubles en agua y tienen una gran afinidad con la materia orgánica del compost, lo que disminuye su disponibilidad, condición fundamental para su biodegradación. Los HAPs de 5 anillos tienen

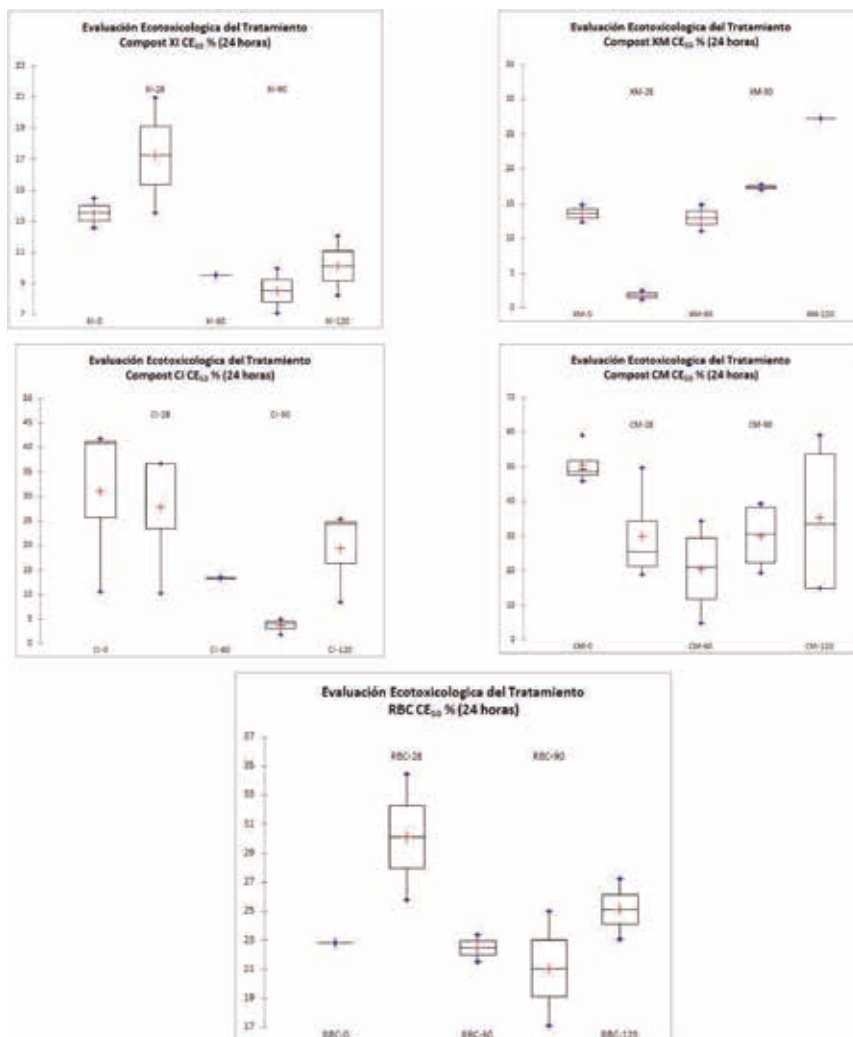
un tiempo de vida media promedio de 34 días superior al de 4 anillos, de estos se observa que el BaP tiene un menor tiempo de vida media, lo que sugiere una mayor biodegradación debido a su mayor solubilidad que los otros de 5 anillos. Los HAPs de 6 anillos menos solubles tienen un tiempo de vida media promedio de 75 días. La biodegradación de los HAPs sigue un mecanismo de mono o dioxidación en diferentes posiciones, seguido por una deshidratación de los dihidrodióles y una ruptura oxidativa usualmente en posición meta<sup>23-25</sup>.

Los tiempos de vida media de los HAPs en muestras de barrido de calles son menores que los presentados en la literatura de suelos y mayores que los presentes en las muestras de compost, debido a que la biodegradación mediada por hongos y bacterias depende de la capacidad de los hongos para adaptarse al sustrato (mayor en compost) y la naturaleza de los HAPs como fuente de carbono para la comunidad microbiana (mayor en residuos de barrido de calles y mezclas con compost que en los suelos)<sup>25</sup>.

### **Efecto ecotóxico y tóxico de los lixiviados de las muestras tratadas y sin tratar**

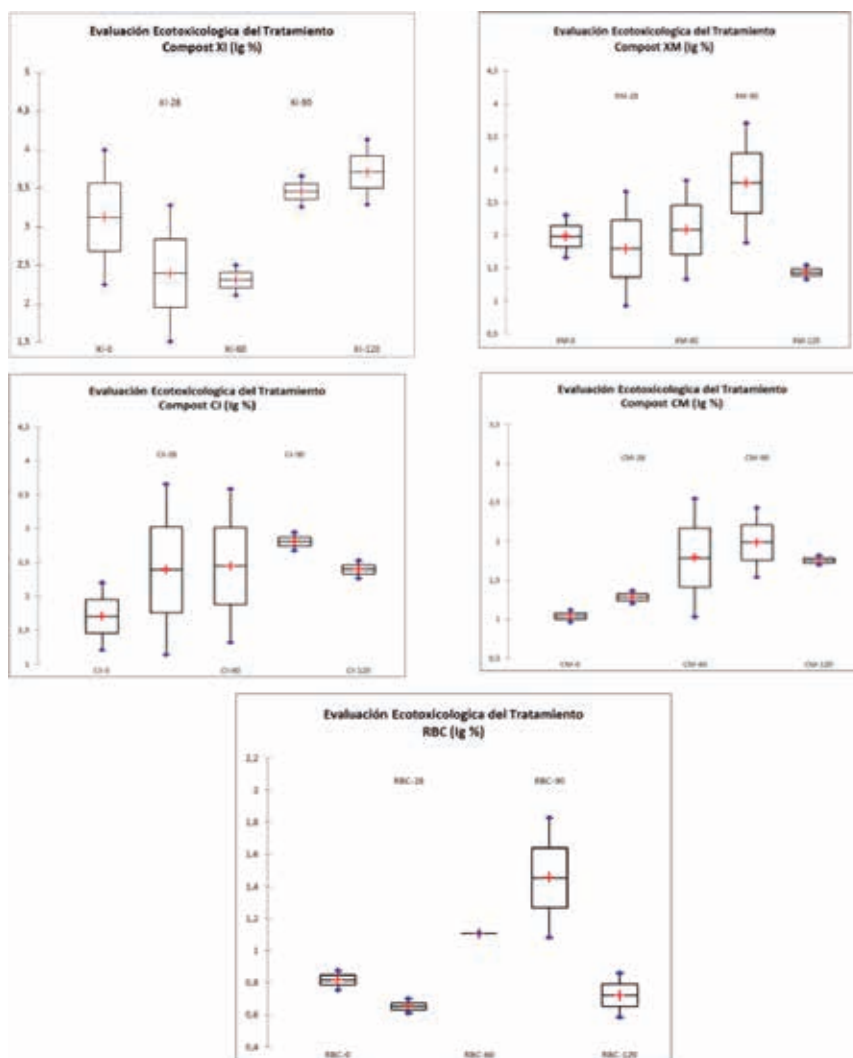
El efecto tóxico, riesgo carcinogénico evaluado como el contenido de BaP<sub>eq</sub>, como se observa en la figura 1, se reduce en más del 66% en todos los tratamientos con compost en 30 días, los tratamientos CI y CM presentan una menor remoción que XI y XM. La muestra de residuos de barrido de calles logra alcanzar una remoción del 60% recién a los 90 días, requiere de una fase previa de acondicionamiento.

Como se observa en la figura 2 las muestras inmaduras XI y X después de un tiempo de 90 días de tratamiento incrementan su efecto ecotóxico sobre *daphnias*, en el caso de las muestras maduras CM y XM esto sucede a los 28 días. Este comportamiento puede deberse a la formación de productos intermediarios con mayor solubilidad en agua como epóxidos y dihidrodióles debido a procesos cometabólicos de los HAPs<sup>26</sup> en la mezcla de residuo de barrido de calles y compost. Por otro lado las muestras maduras inician el proceso de degradación rápidamente debido a la presencia de organismos con capacidad de degradar ácidos húmicos en condiciones aeróbicas, en el caso de las muestras inmaduras es necesario un periodo de adaptación mayor de 60 días.



**Figura 2.** Efecto Ecotoxicológico del Tratamiento CE<sub>50</sub> 24 horas evaluado sobre *Daphnia magna* (n = 4 ensayos)

Como se observa en la figura 3, el índice de germinación evaluado sobre *Lactuca sativa* presenta un compartimiento irregular, en el caso de RBC los valores de índice de germinación son menores a 2,0, los tratamientos con muestras XI y XM, disminuyen su índice de germinación a los 28 días similar a lo observado con las *daphnias*.



**Figura 3.** Efecto Ecotoxicológico del Tratamiento Ig (120 horas) evaluado sobre *Lactuca sativa* (n = 6 ensayos)

Las muestras CI y CM incrementan su índice de germinación hasta los 90 primeros días, a los 120 de tratamiento el índice de germinación disminuyen por motivos que requieren mayor estudio.

Los valores de ecotoxicidad de los tratamientos fueron convertidos en valores de unidad tóxica con la finalidad de poder tener todos los resultados en valores adimensionales que son aditivos y comparables. Los valores de las UT fueron comparados con el promedio de toxicidad y utilizando una escala arbitraria<sup>20,27</sup>, se clasificó la toxicidad de los residuos como sin toxicidad (st) < 1 UT, toxico (t) 1 – 100 UT, muy tóxico (mt) 11 – 100 UT, extremadamente tóxico (et) > 100 UT. Como se observa en la tabla 4, los tratamientos con muestras de compost inmaduros, al cabo de 120 días, han formado metabolitos oxidados con mayor solubilidad y efecto tóxico, pueden ser compuestos epóxidos o dihidroxidos de HAPs<sup>26</sup>. En el caso de tratamientos con muestras de compost maduro CM y XM la ecotoxicidad de las muestras tratadas después de 120 días disminuye, probablemente debido a la formación de compuestos menos tóxicos comparados con los residuos de barrido de calles.

**Tabla 4.** Unidad tóxica de todos los ensayos ecotoxicológicos a 120 días de tratamiento

Residuo	Efecto	Unidad Tóxica				Promedio Ecotoxicidad
		<i>Daphnia magna</i>		<i>Lactuca sativa</i>		
		24 h	48 h	% germinación	Elongación radícula	
RB		3,6753	4,3348	1,7826	6,5359	4,1 (t)
CI		4,1054	11,8315	1,1896	3,4188	5,1 (t)
XI		8,3043	12,1271	1,0000	2,6954	6,0 (t)
CM		1,6893	1,9257	1,7082	3,3272	2,2 (t)
XM		3,6717	3,6724	1,8632	3,7523	3,2 (t)

En la matriz de correlación de Pearson de la tabla 5, se observa que la humedad presenta correlación positiva con la pérdida por ignición (PPI) y relación C/N, presenta correlación negativa con el porcentaje de ácidos húmicos (HA) y contenido de ΣHAPs al final del tratamiento, esto puede deberse a que las muestras húmedas provenientes de XRunner presentan mayor contenido de material orgánico inestable, los microorganismos al adaptarse a este medio cometabolizan a los HAPs en el proceso de formación de ácidos húmicos. La pérdida por ignición se correlaciona positivamente con la relación C/N, ecotoxicidad y negativamente con el contenido de HAPs, esto nos indica que las muestras con mayor contenido de carbono no estable tiene menor cantidad de ácidos húmicos, pero durante el tratamiento cometaboliza los HAPs en el proceso de producción de ácidos húmicos, generando metabolitos ecotóxicos de epóxidos o dihidroxidos de HAPs<sup>26</sup>. El porcentaje de ácidos húmicos se correlaciona positivamente con el % ΣHAPs y % BaP<sub>eq</sub> luego de 120 días de tratamiento, esto se debe a que las muestras con bajo contenido de ácidos húmicos

proviene de XRrunner, donde han sido tratados en condiciones parcialmente anaeróbicas y durante el tratamiento aeróbico han promovido la degradación de la materia orgánica en ácidos húmicos mediante microorganismos capaces de cometabolizar HAPs, reduciendo su concentración<sup>3,8,26</sup>.

**Tabla 5.** Correlación de parámetros toxicológicos, ecotoxicológicos, concentraciones de HAPs al final del tratamiento y composición del compost.

Variables	% Humedad	Ceniza	PPI	C/N	% HA	Ecotoxicidad	% Σ HAPs	%BaP <sub>eq</sub>
% Humedad	<b>1</b>	-0,983	0,869	0,772	-0,745	0,383	-0,857	-0,948
Ceniza		<b>1</b>	-0,932	-0,821	0,775	-0,530	0,822	0,911
PPI			<b>1</b>	0,675	-0,584	0,786	-0,570	-0,700
C/N				<b>1</b>	-0,990	0,368	-0,897	-0,855
% HA					<b>1</b>	-0,232	0,930	0,868
Ecotoxicidad						<b>1</b>	-0,041	-0,152
Σ HAPs							<b>1</b>	0,975
%BaP <sub>eq</sub>								<b>1</b>

## CONCLUSIONES

Los HAPs pueden ser degradados utilizando tratamientos con compost, alcanzando porcentajes de remoción mayores al 60% en 30 días y 80% en 120 días, siguiendo rutas cometabólicas. Muestras de compost que provienen de un proceso anaeróbico antes del aeróbico tienen mayor capacidad para degradar HAPs, alcanzando valores de hasta el 90% de remoción. La degradación de los HAPs, en muestras de compost, forma inicialmente metabolitos más tóxicos que incrementan el efecto tóxico, principalmente entre los días 28 a 60, esto debido a que estos son más solubles en agua haciendo más biodisponibles, luego esta toxicidad disminuye por la biodegradación de los metabolitos y la disminución de la concentración de los HAPs.

Las muestras con compost maduro generan menores efectos ecotoxicológicos y toxicológicos.

## AGRADECIMIENTO

Se agradece a la Dirección General de Investigación de la PUCP (DGI) que a través de los Proyectos anuales de investigación básica y aplicada 2013-0084 en cooperación con el Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental (CIQTOBIA) del Departamento Académico de Química de la UNALM financiaron la investigación.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Kästner M, Lotter S, Heerenklage J, Breuer-Jammali M, Stegmann R, Mahro B. Fate of <sup>14</sup>C-labeled anthracene and hexadecane in compost-manured soil. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1995;43(6):1128-35.
2. Kästner M, Mahro B. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996;44(5):668-75.
3. Reid BJ, Fermor TR, Semple KT. Induction of PAH-catabolism in mushroom compost and its use in the biodegradation of soil-associated phenanthrene. *Environ Pollut.* 2002;118(1):65-73.
4. Plaza C, Xing B, Fernández JM, Senesi N, Polo A. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by humic acids formed during composting. *Environ Pollut.* 2009;157(1):257-63.
5. Carlstrom CJ, Tuovinen OH. Mineralization of phenanthrene and fluoranthene in yardwaste compost. *Environ Pollut.* 2003;124(1):81-91.
6. Lorenzi D, Entwistle JA, Cave M, Dean JR. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban street dust: implications for human health. *Chemosphere.* 2011;83(7):970-7.
7. Bundesgesetzblatt Für Die Republik Österreich (BGBl. II) – Ausgegeben am 14. August 2001 – Nr. 292, pp 1756 – 1776.
8. Binner E., Smidt E., Lechner P. Humic Acids – A Quality Criteria for Composts. Proceedings of the US Composting Councils 15th Annual Conference & Trade Show. 21-23 enero 2007; Orlando, USA.
9. Antizar-Ladislao B, Lopez-Real J, Beck AJ. Laboratory studies of the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil by in-vessel composting. *Wast Manag.* 2005; 25: 281–289.
10. Kúsmerz M, Oleszczuk P, Kraska P, Pałys E, Andruszczak S. Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in biochar-amended soil. *Chemosphere.* 2016; 146: 272 -279.
11. Dong T, Lee B. Characteristics, toxicity, and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in road dust of Ulsan, Korea. *Chemosphere.* 2009; 74:1245–1253.
12. United States Environmental Protection Agency. Compendium Method TO-13A. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Ambient Air Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). En Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air. Second Edition. Cincinnati: EPA; 1999. p13A 24 – 25.
13. United States Environmental Protection Agency. Method 1311: Toxicity Characteristic Leaching Procedure. En Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. Washington DC: Government Printing Office; 1991.
14. Mantis I, Voutsas D, Samara C. Assessment of the environmental hazard from municipal and industrial wastewater treatment sludge by employing chemical and biological methods. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2005; 62: 397–407.
15. United States Environmental Protection Agency. Method 8100: Polynuclear Aromatic

- Hydrocarbons. En *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods*. Washington DC: Government Printing Office; 1986.
16. Wik A, Dave G. Acute toxicity of leachates of tire wear material to *Daphnia magna*—Variability and toxic components. *Chemosphere*. 2006; 64: 1777–1784.
  17. Hamdi H, Manusadzianas L, Aoyama I, Jedidi N. Effects of anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene spiking and sewage sludge compost amendment on soil ecotoxicity during a bioremediation process. *Chemosphere*. 2006; 65: 1153–1162.
  18. Manzo S, De Nicola F, De Luca FP, Maisto G, Alfani A. Assessment of the effects of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests. *Chemosphere*. 2008; 71: 1937–1944.
  19. Sprague JB, Ramsay BA. Lethal effects of mixed copper and zinc solutions for juvenile salmon. *J Fish Res Bd Can*. 1965; 22: 425-432.
  20. Manusadzianas L, Balkelyte L, Sadauskas K, Blinova I, Põllumaa L, Kahru A. Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquat Toxicol*. 2003; 63: 27-41.
  21. Nisbet C, LaGoy P. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Reg Toxicol Pharmacol*. 1992; 16: 290–300.
  22. Wang W, Huang M, Kang Y, Wang H, Leung OW, Cheung KC, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban surface dust of Guangzhou, China: Status, sources and human health risk assessment. *Sci Total Environ*. 2011; 409: 4519–4527.
  23. Fuchs G. Oxidation of organic compounds. En *Biology of the Prokaryotes*. Lengeler JW, Drews G, Schegel HG (edits). Stuttgart: Thieme; 1999. p 187-233.
  24. Izquierdo AR. Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas genes funcionales. [Tesis Doctoral] Barcelona: Universidad de Barcelona; 2013.
  25. Folwell BD, McGenity TJ, Whitby C. Biofilm and Planktonic Bacterial and Fungal Communities Transforming High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *App Environ Microbiol*. 2016; 82: 2288 –2299.
  26. Cerniglia CE. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*. 1992; 3: 351–368.
  27. Persoone G, Goyvaerts M, Janssen C, De Coen W, Vangheluwe M. Cost effective acute hazard monitoring of polluted waters and waste dumps with the aid of Tox kits, Final Report. Commission of European Communities. Contract ACE 89/BE 2/D3. 1993. p. 600.



## SÍNTESIS DE POSIBLES AGONISTAS NICOTÍNICOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD INSECTICIDA

Luis J. Reyes-García<sup>a,b</sup>, Pia Cid<sup>c</sup>

### RESUMEN

El compuesto *N*-bencilpiridina-3-carboxaimidoato de etilo<sup>7</sup> fue preparado mediante la reacción entre *N*-bencilnicotinamida y cloroformiato de etilo, el otro hidrocloreto de imidato de etilo, *N*-(2-feniletil)piridina-3-carboxaimidoato de etilo<sup>8</sup> fue preparado utilizando la misma metodología. El compuesto<sup>6</sup> fue obtenido mediante la síntesis de *N*-bencil-*N*-(2-cianoetil)nicotinamida<sup>4</sup>, el cual fue utilizado como material de partida para obtener *N*-(3-aminopropil)-*N*-bencilnicotinamida<sup>5</sup> empleando una reacción de reducción con Ni-Raney, con buen rendimiento. La reacción de ciclación del compuesto<sup>5</sup> fue realizada utilizando ácido *p*-toluensulfónico. Finalmente, el compuesto<sup>9</sup> fue preparado mediante una benzoylación directa de 1,4,5,6-tetrahidro-2-(3-piridinil)pirimidina.

**Palabras clave:** Síntesis heterociclos, actividad insecticida, tetrahidropirimidinas

## SYNTHESIS OF POSSIBLE NICOTINIC AGONISTS WITH POTENTIAL INSECTICIDE ACTIVITY

### ABSTRACT

Ethyl *N*-benzylpyridine-3-carboximidoate<sup>7</sup> was prepared by reacting *N*-benzylnicotinamide and ethyl chloroformate, the other ethyl imidatehydrochloride, ethyl *N*-(2-phenylethyl)pyridine-3-carboximidoate<sup>8</sup>, was prepared with the same method. Compound<sup>6</sup> was obtained by synthesis of *N*-benzyl-*N*-(2-cyanoethyl) nicotinamide<sup>4</sup>, the latter was used as a starting material to obtain *N*-(3-aminopropyl)-*N*-benzylnicotinamide<sup>5</sup> by reduction with Ni-Raney in good yield. Cyclization reaction was obtained by *p*-toluenesulfonic acid of compound<sup>5</sup>. Finally, compound (5,6-dihydro-2-(pyridin-3-yl)pyrimidin-1(4H)-yl)(2,4-dimethoxyphenyl) methanone<sup>9</sup> was prepared by direct benzoylation of 1,4,5,6-tetrahydro-2-(pyridin-3-yl)pyrimidine.

**Key words:** Heterocycles synthesis, insecticidal activity, tetrahydropyrimidines

<sup>a</sup> Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Santo Tomas, Viña del Mar, Chile  
luisreyesga@santotomas.cl

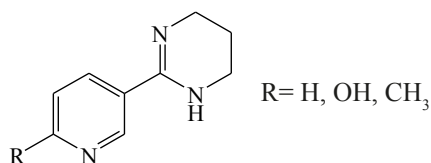
<sup>b</sup> Universidad Andrés Bello, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Quillota 910, Viña del Mar, Chile

<sup>c</sup> Instituto de Química, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Avda. Universidad 330, Curaua, Valparaíso, Chile

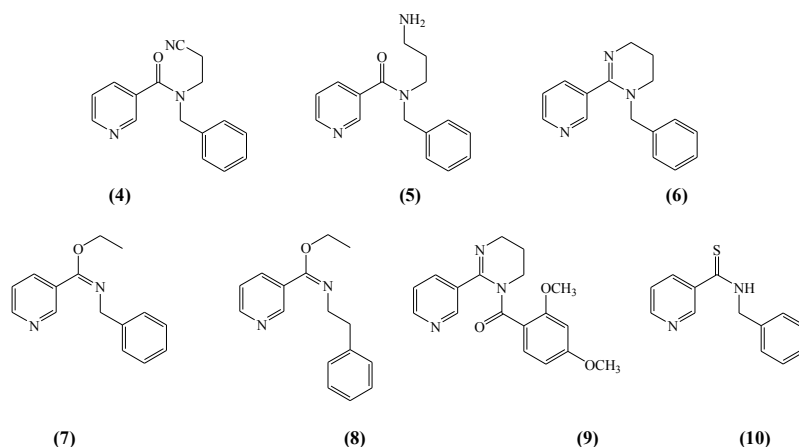
## INTRODUCTION

One of the most promising areas in insecticide development is the identification and synthesis of new compounds that act on the two main points of insecticide action: nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) that are activated by endogenous neurotransmitter acetylcholine and neonicotinoid agonists and acetylcholinesterase (AChE) which are inhibited by organophosphorus and methylcarbamate, which compounds to generate and maintain toxic ACh levels<sup>1,2</sup> localized. Neonicotinoid insecticides (NNSs), which interact with nAChR, have a higher affinity for insect receptors than for mammalian receptors<sup>2-4</sup>, and have attracted the attention of several research groups, because of their interesting insecticidal activity<sup>5-7</sup>.

We have recently reported the synthesis of novel 1,4,5,6-tetrahydro-2-(pyridin-3-yl) pyrimidine analogues<sup>8</sup> (figure 1) and we now have decided to extend our synthetic strategy to prepare novel tetrahydropyrimidines (THPs) and analogue compounds. In this investigation, the design and synthesis of some new compounds that bind to nicotinic acetylcholine receptors are described (figure 2), however, their biological properties remain unexplored.



**Figure 1.** Tetrahydropyrimidine prepared by reaction of 1,3-diaminopropane and nicotinic acid, using boric acid as a catalyst.



**Figure 2.** Chemical structures of 4-10

## MATERIALS AND METHODS

### Synthesis of compounds

Solvents and chemicals were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Melting points were determined with a Reichert Galen III hotplate microscope. <sup>1</sup>H-NMR spectra was recorded in CDCl<sub>3</sub> using Bruker AMX 400 instrument, operating at 400 MHz. Chemical shifts were reported in parts per million with TMS as an internal standard. Coupling constant(s) (*J*) were assigned as hertz. Column chromatography was performed on Merck silica gel 60, 230–400 mesh, and thin-layer chromatography (TLC) was performed on Merck silica gel G. The CHN microanalyses were performed for all synthesized products, within ±0.4 for all nuclei.

**Nicotinoyl chloride (1).** SOCl<sub>2</sub> (60 mL, 813.0 mmol) was added to a solution of nicotinic acid (10 g, 81.3 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The mixture was stirred at room temperature for 5 minutes and then at reflux temperature for 4 more hours. After that, the solvent was evaporated to dryness, the product was crystallizing in a minimum volume of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the product was used immediately for the next step. (10.2 g, yield 89%)

***N*-benzylnicotinamide (2).** K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 g, 46 mmol) was added to a benzylamine (5 mL, 46 mmol) in acetone (50 mL) solution and kept at room temperature, and stored under nitrogen for 15 minutes. After this time a constant stirring nicotinoyl chloride (6.5 g, 46 mmol) dissolved in acetone was added while stirring for 2 hours. Then the solvent was evaporated to dryness, the residue was washed (undiluted) with a 25% NaOH solution (1 x 100 mL) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 100 mL). The organic phase was dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in a vacuum. The oily residue was purified by chromatography on silica gel (MeOH / EtOAc 1:1) and allowed to crystallize in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. 4.8 g of *N*-benzylnicotinamide with 50% yield was obtained. (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 4.51 (s, 2H), 7.21-7.36 (m, 5H), 7.50-7.55 (m, 1H), 8.21-8.26 (m, 1H) 8.69-8.75 (m, 1H), 9.05 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 44.4, 125.0, 126.9, 127.3, 127.4, 128.1, 128.2, 130.8, 137.0, 141.9, 146.3, 153.5, 167.9. Anal. Calcd for C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O: C, 73.56; H, 5.70; N, 13.20; O, 7.54%. Found: C, 73.47; H, 5.67; N, 13.17%.

**3-(benzylamino)propanenitrile (3).** Phenylmethanamine (16 mL, 152 mmol) in methanol (25 ml) was added to acrylonitrile (43.4 mL, 661.5 mmol) in methanol (40 mL) at 0 °C dropwise over 30 minutes. The ice bath was removed, and the solution was heated up to 45°C and stirred for 16 hours. The acrylonitrile solvent and excess were removed in vacuum to obtain the title compound **3** (22.7 g, 93% yield) as a yellow oil: <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.52 (t, *J* = 2.2 Hz, 2H), 2.83 (2H, t, *J* = 2.2 Hz), 3.83 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 19.2, 44.6, 54.1, 136.5, 127.3, 127.9, 128.0, 128.6, 128.7. Anal. Calcd for C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>: C, 74.97; H, 7.55; N, 17.48%. Found: C, 74.90; H, 8.02; N, 17.41%.

***N*-benzyl-*N*-(2-cyanoethyl)nicotinamide (4).** NaOH (1.5 mL, 40%) and nicotinoyl chloride (1.6 g, 13 mmol) was added to a 3-(benzylamino)propanenitrile (2.0 g, 13 mmol) in acetone (50 mL) solution, and the mixture was stirred at 0°C for 2 h. After this, the solvent was

evaporated to dryness and the residue was washed with a 25% NaOH (1 x 100 mL) solution, extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 100 mL), dried over sodium sulfate, and concentrated to dryness. The residue was subjected to chromatography on silica gel, eluting with MeOH / EtOAc 1:1. Recrystallization from acetone made 2.58 g (75%) of **4** as white needles. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.51 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz), 2.92 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, *J* = 6.6 Hz), 3.83 (s, 2H), 7.29-7.40 (m, 5H), 7.75-7.82 (m, 1H), 8.13-8.27 (m, 1H), 8.58-8.63 (m, 1H), 8.96 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 16.4, 44.8, 49.7, 118.1, 125.1, 127.1, 128.0, 128.1, 128.6, 128.7, 131.5, 136.5, 138.3, 149.2, 152.7, 169.0. Anal. Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O: C, 72.43; H, 5.70; N, 15.84; O, 6.03%. Found: C, 72.38; H, 5.73; N, 15.72%.

***N*-(3-aminopropyl)-*N*-benzylnicotinamide (5).** *N*-benzyl-*N*-(2-cyanoethyl) nicotinamide (0.80 g, 3.0 mmol), methanolic ammonia (7 N, 100 mL), and Raney nickel (5 mL, washed three times with MeOH) were added to a 500 mL hydrogenation flask. The flask was transferred to a stainless Steel Parr shaker hydrogenation apparatus, charged with hydrogen (50 psi), and shaken (for 1 minute). The flask was evacuated under aspiration in vacuum (1 min) and then charged with hydrogen (50 psi, 1 min) three times, the resultant slurry/solution was shaken under hydrogen at 50 psi for 24 h. The catalyst was removed by filtration through a Celite (washed with methanol) pad, and the solution was concentrated in vacuum. The material that was obtained (a green-blue solid) was dissolved in 95% EtOH (100 mL), and Dowex monosphere 300A (-OH) anion exchange resin (21.5 mL, 25.8 mmol -OH) was added to the obtained solution. The slurry was refluxed for 24 h, cooled to rt, and the resin was removed by gravity filtration. The resin was then washed with 95% EtOH (2 x 50 mL), and the combined filtrate was concentrated in vacuum to obtain the nickel free title compound (0.5 g, 62 % yield) as a yellow oil: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 1.59 (q, 2H, *J* = 6.8), 3.04 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 3.42 (t, 2H, *J* = 5.8 Hz), 4.17 (s, 2H), 7.29-7.38 (m, 5H), 7.41-7.49 (t, 1H, *J* = 6.5 Hz), 8.04 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 8.55-8.62 (m, 1H), 8.70 (s, 1H, H-2); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 29.3, 39.6, 43.7, 49.5, 125.3, 126.9, 128.0, 128.1, 128.6, 128.7, 130.9, 136.8, 138.6, 148.2, 153.7, 169.0. Anal. Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O: C, 71.35; H, 7.11; N, 15.60; O, 5.94%. Found: C, 71.30; H, 7.02; N, 15.11%.

**1-benzyl-1,4,5,6-tetrahydro-2-(pyridin-3-yl)pyrimidine (6).** A *p*-toluenesulfonic acid (0.26 g, 1.7 mmol) was added to a solution of *N*-(3-aminopropyl)-*N*-benzylnicotinamide (50 mg, 0.185 mmol) in toluene (50 mL) and heated to reflux with constant stirring for 24 h. After this, the solvent was evaporated to dryness and the residue was subjected to chromatography on silica gel, eluting with MeOH / EtOAc 1:1, 1-benzyl-1,4,5,6-tetrahydro-2-(3-pyridinyl)pyrimidine as the free base (37 mg of 84% yield) was obtained. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 2.17-2.21 (m, 2H), 2.67-2.72 (m, 2H), 3.39-3.43 (m, 2H), 3.83 (s, 2H), 7.27-7.34 (m, 5H), 7.49-7.56 (m, 1H), 7.96-8.04 (m, 1H), 8.61-8.69 (m, 1H), 8.75 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 20.5, 39.7, 46.5, 50.1, 124.9, 127.0, 128.0, 128.1, 128.6, 128.7, 132.8, 136.7, 137.9, 149.3, 153.5, 158.9. Anal. Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>: C, 76.46; H, 6.82; N, 16.72%. Found: C, 76.36; H, 6.69; N, 16.75%.

**Ethyl *N*-benzylpyridine-3-carboximidoate (7).** Ethyl chloroformate (1 mL, 9.5 mmol) was added to *N*-benzylnicotinamide (1.0 g, 4.7 mmol) and kept at 50 °C for 2 hours. The solvent

removal by evaporation left the residue which was purified by column chromatography on silica gel (eluted by MeOH) as to obtain an ethylimidate hydrochloride derivative (1.33 g, 85%) as a colorless oil.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  1.60 (t, 3H,  $J = 7$  Hz), 3.97 (s, 2H), 4.56-4.60 (m, 2H), 7.35-7.39 (m, 5H), 8.10-8.16 (m, 1H), 8.20-8.30 (m, 1H), 8.76-8.82 (m, 1H), 9.22 (s, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 15.1, 55.1, 59.1, 124.1, 125.7, 128.6, 128.7, 129.3, 129.4, 132.8, 137.4, 138.9, 152.1, 153.3, 162.6. Anal. Calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ : C, 74.97; H, 6.71; N, 11.66; O, 6.66%. Found: C, 74.77; H, 6.73; N, 11.57%.

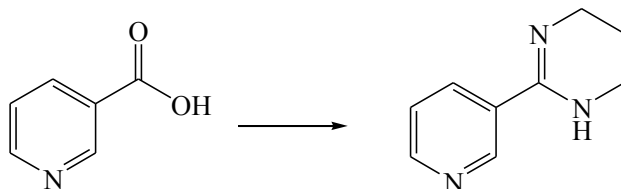
**Ethyl N-(2-phenylethyl)pyridine-3-carboximidoate (8).** This procedure was the same as described above for the preparation of **1**. Ethyl *N*-phenyl nicotinamide (2.0 g, 8.84 mmol). Ethyl chloroformate (2 mL, 17.7 mmol). (1.36 g, 59%) as a colorless oil.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  1.57 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz), 2.91 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 3.65 (t, 2H,  $J = 6.6$  Hz), 4.61 (c, 2H,  $J = 7.1$  Hz), 7.21-7.32 (m, 5H), 8.02-8.11 (m, 1H), 8.58-8.64 (m, 1H), 8.91-8.94 (m, 1H), 9.04 (s, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 15.4, 37.9, 52.1, 58.7, 124.2, 125.8, 127.9, 127.9, 129.1, 129.1, 133.6, 138.3, 139.7, 151.5, 152.2, 162.4. Anal. Calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ : C, 75.56; H, 7.13; N, 11.01; O, 6.29%. Found: C, 75.47; H, 7.15; N, 11.07%

**(5,6-dihydro-2-(pyridin-3-yl)pyrimidin-1(4H)-yl)(2,4 dimethoxyphenyl)methanone(9).** Butyllithium (6.5 mL, 2 M cyclohexane, 12.4 mmol) was added to a 1,4,5,6-Tetrahydro-2-(pyridin-3-yl)pyrimidine solution. (1.0 g, 6.2 mmol) in THF (50 mL) and the mixture was stirred at  $0^\circ\text{C}$  for 35 minutes under a nitrogen atmosphere. After this, a 2,4-dimethoxybenzoic acid (1.2 g, 6.2 mmol), in THF (15 mL) solution was added dropwise, and the mixture was stirred during 20 minutes, and then treated with MeOH and the solvent was removed in a vacuum. The residue was purified by chromatography on silica gel (MeOH-ethyl acetate 1:1), The residue was recrystallized from ethyl ether to obtain compound **9** as a white solid (0.42 g, 21%).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  1.97 (q, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 3.61 (t, 2H,  $J = 5.8$  Hz), 3.57 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.79 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 7.27-7.34 (m, 3H), 7.49-7.56 (m, 1H), 7.96-8.04 (m, 1H), 8.61-8.69 (m, 1H), 8.75 (s, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 19.5, 40.9, 46.6, 55.7, 56.2, 100.7, 106.7, 110.6, 124.3, 130.2, 132.8, 137.6, 150.3, 151.5, 152.3, 159.9, 165.3, 175.1. Anal. Calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ : C, 66.45; H, 5.89; N, 12.91; O, 14.75%. Found: C, 66.53; H, 5.81; N, 12.87%

**N-benzylpyridine-3-carbothioamide (10).** Lawesson's reagent (1.1 g, 4.7 mmol) was added to a *N*-benzylnicotinamide (1.0 g, 4.7 mmol) in toluene (20 mL) solution and the mixture was boiled under reflux for 2 hours. After this, the solvent was removed by a rotary evaporator and the residue was purified by chromatography on silica gel (dichloromethane-ethyl acetate 20:1). The residue was recrystallized from ethyl acetate and compound **10** was obtained as a yellow solid (440 mg, 41%).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  4.98 (d, 2H,  $J = 5.4$  Hz), 7.25-7.41 (m, 5H), 7.45-7.50 (m, 1H), 8.09-8.14 (m, 1H), 6.65-6.68 (m, 1H), 8.90-8.93 (s, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 49.1, 123.1, 126.9, 127.0, 127.1, 128.4, 128.5, 137.1, 138.2, 141.9, 151.8, 153.2, 198.7. Anal. Calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}$ : C, 68.39; H, 5.30; N, 12.27; S, 14.04%. Found: C, 68.27; H, 5.27; N, 12.31%.

## RESULTS AND DISCUSSIONS

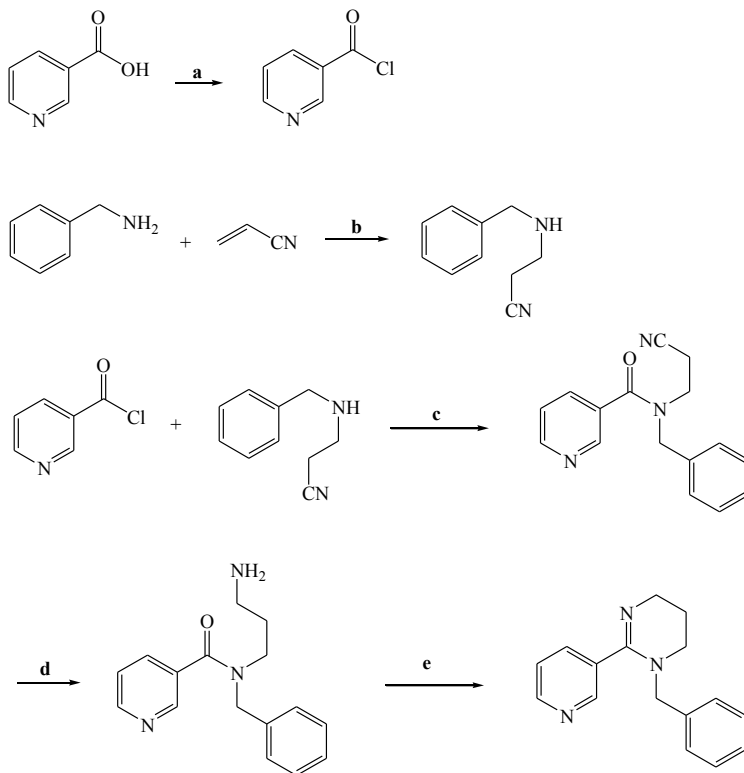
This research's goal was to develop a new synthetic strategy for tetrahydropyrimidinic systems and also to structurally prepare related compounds by having new nicotinic agonists with insecticidal activity. In a previous article, the synthesis of 2-(pyridin-3-yl)-1,4,5,6-tetrahydropyrimidines derivatives by the one pot method using boric acid as the main catalyst (scheme 1) was reported.



**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a)  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , toluene (35%)

Although the reaction is an easy strategy for these types of compounds, the low reactivity observed of the pyrimidine system from acid chlorides, make it difficult to obtain benzylated and benzoylated systems in good yield, only the use of a strong base such as BuLi allowed to obtain **9** in a yield of 21%. The synthesis of **6** using this method was only possible in a yield which is not higher than 2% (not shown data). As an alternative for the synthesis of **6**, all pertaining to the route described in 1966 by Oedigeret, all **3** steps were performed. Compound **3**'s formation had more than 90% efficiency and did not require chromatographic purification. We tried to obtain 3-(phenethylamino)propanenitrile using this methodology. However, the formation of 3,3'-[(2-phenylethyl)azanediyl]dipropanenitrile was in a yield of 78% (unpublished data).

Compound **5** was obtained with the reduction of the cyano group of N-(3-aminopropyl)-N-benzylnicotinamide using Raney Nickel (scheme 2). A green-blue (complex nickel) solid formation was observed. Finally, compound **5** was obtained as a free base using an exchange of anion-resin with a yield of 62%.



**Scheme 2.** Reagents and conditions: (a)  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (89%); (b) MeOH (93%); (c) NaOH 40%, acetone (75%); (d) Raney nickel, methanolic ammonia 7N, (62 %); (e) p-toluenesulfonic acid, toluene (84%).

## CONCLUSION

In conclusion, we have described an efficient protocol for obtaining compounds with potential insecticide activity. Generally speaking, a high maintenance synthesis is shown with a low reaction time, and also soft reaction conditions.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are pleased to acknowledge financial support from the CONICYT grant AT-24121055.

## REFERENCES

1. Casida JE, Quistad GB. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu Rev Entomol.* 1998; 43:1-16.
2. Bai D, Lummis SCR, Leicht W, Breer H, Sattelle DB. Actions of imidacloprid and a related nitromethylene on cholinergic receptors of an identified insect motor neurone. *Pestic Sci.* 1991; 33: 197-204.
3. Mori K, Okumoto T, Kawahara N, Ozoe Y. Interaction of dinotefuran and its analogues with nicotinic acetylcholine receptors of cockroach nerve cords. *Pest Manag Sci.* 2001; 58 (2): 190-196.
4. Maienfisch P, Brandl F, Kobel W, Rindlisbacher A, Senn R. CGA 293'343: A novel, broad-spectrum neonicotinoid insecticide. En: *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor* [Internet]. Tokyo: Springer; 1999. p. 177–209.
5. Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22(11):573-80.
6. Liu Z, Yao X, Zhang Y. Insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs): Important amino acid residues contributing to neonicotinoid insecticides selectivity and resistance. *Afr J Biotechnol.* 2008; 7 (25): 4935-4939.
7. Tian Z, Jiang Z, Li Z, Song G, Huang Q. Syntheses and Biological Activities of Octahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidine Derivatives. *J Agr Food Chem.* 2007; 55: 143-147.
8. Reyes-García L. (2013). Facile synthesis of tetrahydropyrimidines with possible insecticidal activity. *Rev Bol Quim.* 2013; 30(1): 66-69.



## APROVECHAMIENTO DE PELOS DE VACUNO DEL PROCESO DE PELAMBRE ENZIMÁTICO DE LAS CURTIEMBRES EN LA REMOCIÓN DE PLOMO

Carmen Carola Palomino Amorína<sup>\*</sup>; Rocío Vargas Parker<sup>b</sup>; Lizardo Visitación Figueroa<sup>a</sup>

### RESUMEN

En este estudio, los residuos de pelos del proceso de pelambre enzimático (PPE) de una curtiembre fueron utilizados como adsorbentes para la remoción de plomo de una solución. Los residuos de pelos fueron tratados con hidrólisis ácida y utilizados en experimentos de adsorción tipo Batch en los cuales se evaluó el efecto del pH en la adsorción así como también el mecanismo de adsorción para lo cual se realizaron los estudios de las isothermas de adsorción y la cinética de adsorción de Pb (II) sobre los pelos tratados. Los resultados obtenidos mostraron que la adsorción de Pb (II) fue dependiente del pH siendo el pH óptimo de 7. Los estudios de la isoterma mostraron que los datos experimentales se ajustan con el modelo de la isoterma de Langmuir para los pelos tratados del proceso de pelambre enzimático (PTPE). La capacidad máxima de adsorción fue de 321,0 mg de Pb (II)/g de bioadsorbente (PTPE). Los estudios de cinética mostraron que el modelo de reacción de pseudo-segundo orden describe mejor el proceso de adsorción. Por último, el estudio mostró que los residuos de pelos del proceso de pelambre enzimático pueden ser utilizados como adsorbentes eficientes para la remoción de plomo (II).

**Palabras clave:** Pelo, plomo (II), adsorción, hidrólisis ácida, curtiembre.

### ABSTRACT

In this study, waste hairs of the enzymatic unhairing process (PPE) of tannery were used as adsorbents to remove lead of a solution. Waste hairs were treated with acid hydrolysis and used in the type batch adsorption experiments, to be examined the effect of pH on the adsorption and also to investigate the mechanism of adsorption for which studies adsorption isotherms and the adsorption kinetics of Pb (II) were performed on treated hairs. The results showed that adsorption of Pb (II) was pH dependent with the optimum pH of 7. Isotherm studies showed that experimental data match the pattern of the Langmuir isotherm for the case of treated hairs of the enzymatic unhairing process (PTPE). The maximum adsorption capacity was 321.20 mg Pb (II)/g of bioadsorbent (PTPE). The kinetic studies showed that

---

<sup>a\*</sup> Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.  
e-mail: carolapa16@gmail.com

<sup>b</sup> Helianthus SAC, Laboratorio de desarrollo e investigación curtiembre, Av. Guardia Civil 314 Chorrillos - Lima-Perú.

the reaction model of pseudo-second order best describes the adsorption process. Finally, the study showed that residues of hairs of the enzymatic unhairing process can be used as effective adsorbents for the removal of lead (II).

**Key words:** Hair, lead (II), adsorption, acid hydrolysis, tannery.

## INTRODUCCIÓN

El pelambre en una curtiembre constituye una de las operaciones más contaminantes debido a la elevada carga de materia orgánica (proteínas, básicamente queratina y grasas suspendidas, así como compuestos tensoactivos usados como humectantes del cuero) e inorgánica como sulfuro, cal y otros en las aguas residuales<sup>1</sup>. Estas descargas en cuerpos de agua degradan la calidad de las mismas, ocasionando daños ambientales muchas veces irreversibles. Un cuerpo de agua contaminado por estas aguas residuales disminuye su valor de uso como agua para bebida o para fines agrícolas e industriales, afecta la vida acuática, genera mortandad de peces por disminución del oxígeno disuelto y el agua se convierte en no apta para el consumo.

Las formulaciones para la operación de pelambre varían, dependiendo del tipo de piel que se procese y del método de pelambre empleado. Los métodos de pelambre más comunes son: Pelambre de tipo convencional con destrucción de pelo, empleando sulfuro de sodio y cal y el pelambre con recuperación de pelo, que puede realizarse por diversos métodos, entre ellos el pelambre enzimático, que consiste en la combinación de enzimas (proteasas y queratinasas) con sulfuro, que remueven más eficientemente el pelo<sup>2</sup>.

Pelos y plumas son subproductos residuales de industrias tales como las de curtido de pieles, las chacineras, los mataderos de pollos, etc. En la mayoría de los casos, estas biomásas, constituidas casi al 100% por la proteína más abundante en el planeta, es decir, la queratina, son incineradas o biodegradadas en vertederos sin llegar a ser utilizadas en diferentes procesos tecnológicos aplicados<sup>3</sup>.

Por tanto, el uso de adsorbentes a base de materiales orgánicos surge como una alternativa industrialmente atractiva como agentes de retención de metales debido a sus ventajas sobre otros tipos de tratamiento, como lo son: su capacidad de disminuir la concentración de iones metálicos a niveles de partes por billón (ppb), debido a su alta afinidad por los cationes metálicos, su fácil disponibilidad así como por su relativo bajo costo de elaboración<sup>4</sup>.

En particular, las proteínas de queratina son materiales potencialmente útiles para usar en los sistemas de adsorbentes o filtración para la eliminación de contaminantes tóxicos, debido al número de grupos funcionales presentes en las cadenas principales y secundarias de las proteínas,<sup>5</sup> entre ellos tenemos a los grupos carboxilo (R-COOH), hidroxilo (R-OH), amino (R-NH<sub>2</sub>) y sulfhidrilo (R-SH). Entre los grupos funcionales, los átomos de azufre pueden coordinar más fácilmente con los iones de metales pesados. Por lo tanto, estos grupos funcionales permiten la fuerte atracción de los iones metálicos a las materias queratínicas,

dándoles propiedades bioadsorbentes ideales para eliminación de metales pesados de las aguas residuales<sup>6</sup>.

Por otra parte, el plomo presente en aguas industriales de desecho constituye un problema ambiental de gran magnitud en razón de su elevada toxicidad para los organismos vivos. Las fuentes de contaminación por plomo para aguas naturales son diversas, siendo la principal la descarga de efluentes industriales directamente a fuentes naturales sin ningún tratamiento previo. Este problema se debe tanto a los altos costos como a la baja eficiencia de muchos de los métodos empleados para la remoción de los metales pesados.

A partir de lo mencionado anteriormente y como objetivo principal de este trabajo de investigación, se evaluó la posibilidad de utilizar los residuos de pelos de vacuno del proceso de pelambre enzimático como material adsorbente, capaz de remover el plomo de soluciones.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **Materiales y métodos:**

#### **Material adsorbente de residuos de pelos:**

Se colectaron muestras de 2 kg de residuos de pelos de vacuno del proceso de pelambre enzimático de la industria de curtiembre. Estos residuos fueron donados por la empresa HELIANTHUS SAC, situada en el distrito de Chorrillos, departamento de Lima. Los residuos de pelo fueron lavados con 100% de agua a 28°C (2 L), 5% de sulfato de amonio (0,1 kg), 0,5% de Tandestal BASE (0,01 kg) y 1,0 % de Tanplex FLA (0,02 kg) por un tiempo de 10 minutos con el fin de desencalarlos y disminuir el pH 12 hasta 7. Luego se lavaron con agua, se escurrieron y finalmente se secaron a temperatura ambiente.

#### **Hidrólisis ácida de la queratina de pelos de vacuno y caracterización**

La hidrólisis ácida de las muestras de pelos se realizó con HCl 8M (15,1mL/g pelo) durante 16,5 h, luego fueron lavados con agua destilada, secados a temperatura ambiente, tamizados y homogenizados<sup>3</sup>. Los pelos fueron analizados después del tratamiento de hidrólisis ácida, por espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) en el equipo SHIMADZU IR Prestige-21.

#### **Determinación del plomo:**

La determinación de la concentración de Pb (II) en las soluciones filtradas se realizó utilizando como referencia el método 3310 B (espectrofotometría de adsorción atómica de flama) del Standard Methods (1998).

#### **Efecto del pH en la adsorción:**

Se realizaron mezclas de 50 ml de una solución de 1,0 mg/L de Pb(II) con 0,1 g de residuos de pelos tratados del pelambre enzimático (PTPE), se les ajustó el pH a 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 y 8,0 y se agitaron durante 4 horas. Luego se filtraron, utilizándose la concentración de

plomo de las soluciones resultantes para determinar la capacidad de bioadsorción de plomo en función del pH<sup>7</sup>. La cantidad de iones adsorbidos en el equilibrio fue calculada con la ecuación<sup>9</sup>:

$$q_e \text{ (mg/L)} = \frac{(C_i - C_e)V}{W}$$

y el porcentaje de remoción fue calculado con la ecuación:

$$R(\%) = \frac{C_i - C_e}{C_i} \times 100$$

Donde  $q_e$  es la cantidad de adsorción en el equilibrio del metal (mg/g),  $V$  es el volumen de la solución muestra (L),  $W$  es el peso del adsorbente (g) y  $C_i$  y  $C_e$  son las concentraciones del metal en la solución acuosa (mg/L) antes y después del proceso de adsorción, respectivamente.

### Isotermas de adsorción

Se mezclaron 50 mL de soluciones de 25, 50, 125, 250, 500, 700 y 1000 mg/L de plomo (II) con 0,1 g de PTPE (adsorbente), se les ajustó a pH = 7 y se agitaron durante 30 minutos. Posteriormente se determinó el contenido de plomo en las soluciones filtradas por espectrofotometría de absorción atómica para evaluar la capacidad máxima de adsorción ( $q_{\text{máx}}$  o  $Q_m$ ) de plomo<sup>7</sup>. Los resultados experimentales fueron correlacionados con los siguientes modelos de isotermas:

*Para la forma lineal de la isoterma de Langmuir, la ecuación usada fue:*

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q_m k_a} + \frac{1}{Q_m} * C_e$$

Donde:  $Q_m$  = Tasa máxima de adsorción del adsorbato (mg de adsorbato/g biosorbente),  $k_a$  = constante relacionada con la afinidad del biosorbente por el adsorbato.

Una gráfica de  $C_e/q_e$  versus  $C_e$  debe indicar una línea recta de pendiente  $1/Q_m$  y un intercepto de  $1/(Q_m * k_a)$ .

*Para la forma lineal de la isoterma de Freundlich, la ecuación utilizada fue la siguiente:*

$$\log q = \frac{1}{n} \log C_e + \log K$$

Donde:  $q$  = concentración de soluto adsorbido por unidad de peso de adsorbente (mg/g).  $C_e$  = es la concentración del soluto en equilibrio (mg/L).  $n$  = Constante relacionada con la intensidad de sorción del biosorbente en función de su grado de heterogeneidad.  $K$  = Constante de Freundlich relacionada a la capacidad de sorción del biosorbente.

### **Cinética de adsorción**

Se realizaron mezclas de 15 mL de una solución de 3000 mg/L Pb (II) con 0,1 g de PTPE, se ajustaron a pH = 7 y se agitaron por periodos determinados (0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360 y 480 minutos). Luego se analizó el contenido de plomo en las soluciones filtradas. Los resultados experimentales fueron correlacionados con los siguientes modelos cinéticos:

La ecuación linealizada del modelo cinético pseudo-primer orden:

$$q_e \text{ (mg/L)} = \frac{(C_i - C_e)V}{W}$$

Donde:  $q_e$  y  $q_t$  = son las capacidades de adsorción (mg/g) en el equilibrio y en el momento  $t$ , respectivamente.  $k_1$  = es la constante de adsorción de pseudo-primer orden (L/min).

La ecuación linealizada del modelo cinético de pseudo-segundo orden:

$$R(\%) = \frac{C_i - C_e}{C_i} \times 100$$

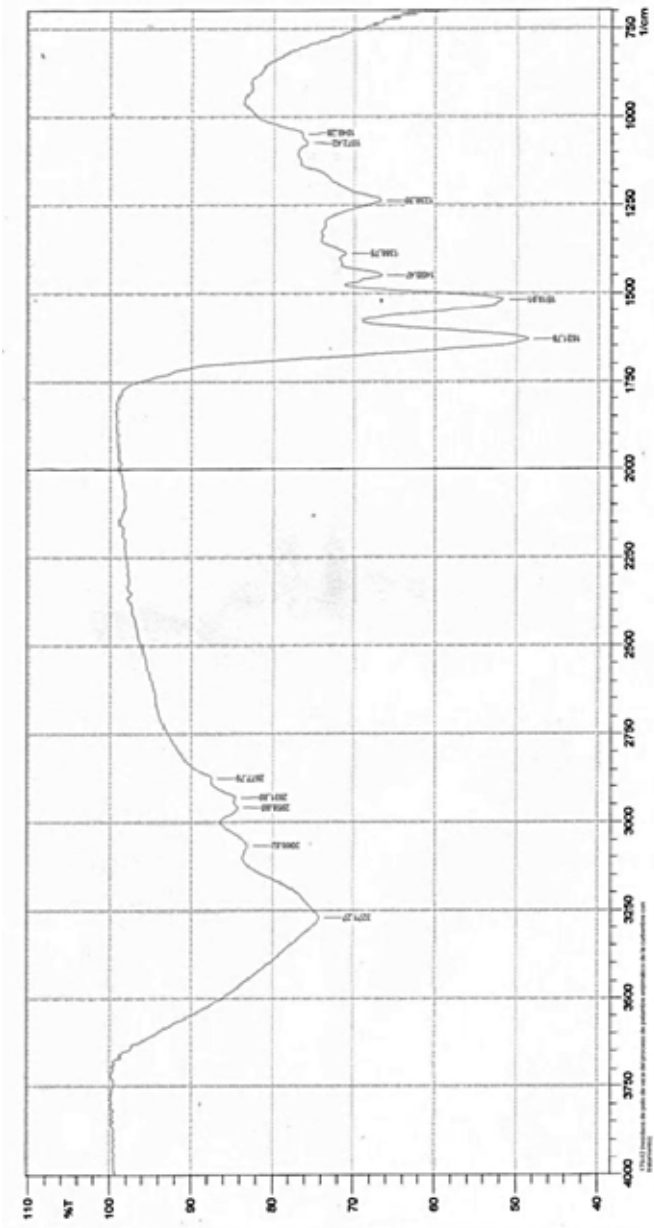
La capacidad de adsorción en el equilibrio y en el tiempo  $t$  son representados por  $q_e$  y  $q_t$  (mgg-1), respectivamente y  $k_2$  es la constante de adsorción de pseudo-segundo orden (g/(mg•min)).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

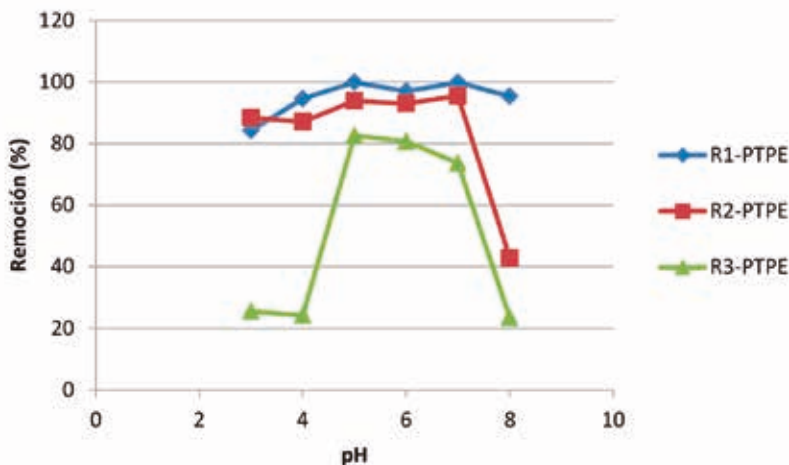
En la figura 1 se representa el espectro infrarrojo de los PTPE, en la cual se observan las bandas de adsorción a 3271.27  $\text{cm}^{-1}$  atribuida al NH extendido, las bandas características de la queratina en los picos a 1631.78 (Amida I), 1519.91 (Amida II) y 1238.30  $\text{cm}^{-1}$  (Amida III) y los productos de oxidación de la cistina en las bandas de adsorción a 1072.42  $\text{cm}^{-1}$  (monóxido de cistina) y a 1200-1150  $\text{cm}^{-1}$  (sulfonatos). Asimismo, se observa un pico a 1049.28  $\text{cm}^{-1}$  que representa a los ácidos sulfónicos, producto de la oxidación de los grupos tiol. Estos grupos se forman cuando el enlace disulfuro de la cistina se rompe por acción del sulfuro de sodio utilizado en el proceso de pelambre. Estos grupos son muy reactivos y se oxidan fácilmente generando productos con diversos estados de oxidación, como por ejemplo el ácido sulfónico, sulfonatos, etc. Los pelos tienen varios grupos funcionales (hidroxilo, amino, carboxilo y grupos conteniendo azufre como sulfonatos<sup>6</sup>) que tienen gran potencial de unión de metales, sin embargo, los principales grupos ionizables de unión catiónica en los biopolímeros son los carboxilos, fosfatos y sulfatos orgánicos<sup>8</sup>. Las especies químicas de plomo muestran una alta afinidad hacia grupos que contienen azufre<sup>9</sup>.

En la figura 2 se representa el efecto del pH en la adsorción, este estudio se realizó en un rango de pH de 3 a 8 en condiciones constantes, en el cual se determinó que el pH en el que se produce la mayor remoción de Pb (II) por los residuos de pelos tratados del proceso de pelambre enzimático de la curtiembre (PTPE) está en el rango de 5 a 7, considerándose el pH 7 como óptimo.

Asimismo, se observa en esta figura que con el aumento en el pH de 3 a 5, el porcentaje de remoción de Pb (II) aumentó hasta llegar a un rango de pH de 5 a 7 en donde el porcentaje de remoción se mantiene relativamente constante, dándose en estos valores la mayor remoción. Sin embargo, con un incremento de pH mayor a 7 el porcentaje de remoción disminuye.



**Figura 1.** Espectro infrarrojo de los residuos de pelos tratados del proceso de pelambre enzimático (PTPE) de la curtiembre.



**Figura 2.** Efecto del pH en la adsorción del plomo (II) sobre residuos de pelo tratados del pelambre enzimático (PTPE) para tres repeticiones (R1, R2, R3).

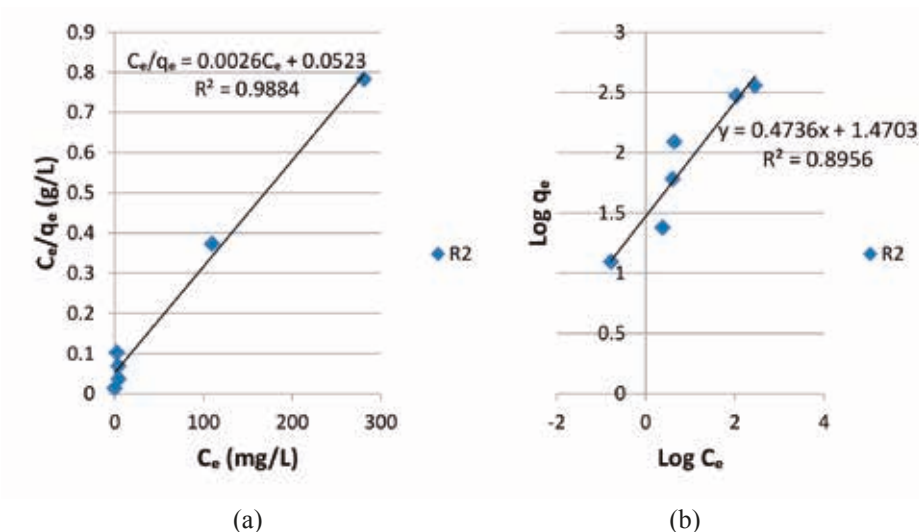
El hecho que en medios muy ácidos disminuya de forma importante el porcentaje de remoción de plomo, podría ser el resultado de la competencia entre protones y los iones de plomo por los lugares de sorción, con una aparente preponderancia de los iones  $H^+$  quedando cargados positivamente, lo que limita la aproximación de los cationes del metal como la consecuencia de las fuerzas de repulsión<sup>10-12</sup>. A medida que se eleva el pH del medio, el porcentaje de remoción de Pb (II) aumenta esto puede ser explicado por qué la superficie adsorbente es desprotonada y cargada negativamente pudiendo producirse la biosorción de los cationes metálicos<sup>13</sup>. Por otra parte, en valores superiores a pH 8, el Pb (II) en solución, empieza a precipitar y, por tanto, existe menos plomo disponible para ser retenido por el biosorbente<sup>7</sup>, lo cual es confirmado con el diagrama de Pourbaix del sistema Pb-O-H, que muestra la formación de un precipitado de  $Pb(OH)_2$  a un  $pH > 8$ , con lo cual habría menos plomo disuelto en la solución en estas condiciones.

Además, la queratina se comporta como un material aniónico cuando el pH de la solución es mayor que su punto isoeléctrico de 4.5<sup>5</sup>, por tanto, el pH óptimo (pH 7) escogido en este estudio favoreció el comportamiento aniónico de la queratina lo que permitió la unión del Pb (II) a los residuos de pelos.

En el estudio de isothermas de adsorción, los datos obtenidos se ajustaron al modelo linealizado de Langmuir y Freundlich, estableciéndose que el modelo de isoterma de Langmuir para tres repeticiones ( $r^2$  promedio = 0,98, ver tabla 1) describe una mejor isoterma que el modelo

de Freundlich ( $r^2$  promedio = 0,78, ver tabla 1), debido a que tiene un mayor coeficiente de correlación, es decir, la ecuación linealizada del modelo representa de forma más exacta los resultados experimentales obtenidos. Esto sugiere que la adsorción de Pb (II) en los PTPE se produce a través de una adsorción monocapa sobre la superficie del adsorbente. Asimismo, indica que los grupos funcionales que se encuentran en la superficie del adsorbente actúan como sitios de adsorción de Pb (II) y adsorben el Pb (II) uno sobre uno<sup>14</sup>.

En la figura 3 a y b se observan los modelos linealizados de la isoterma de Langmuir y de la isoterma de Freundlich más representativos, obtenidos con los datos experimentales resultantes de la adsorción de Pb (II) sobre los residuos de pelos tratados, respectivamente. Comparando, se puede observar cómo los datos experimentales se ajustan mejor a la isoterma de Langmuir.



**Figura 3.** (a) Modelo linealizado de la isoterma de Langmuir de la adsorción de Pb (II) sobre PTPE (R2). (b) Modelo linealizado de la isoterma de Freundlich de la adsorción de Pb (II) sobre PTPE (R2).



Así también, en la tabla 1 se presentan los parámetros obtenidos de los modelos linealizados de la isoterma de Langmuir y la isoterma de Freundlich de la adsorción de Pb (II) sobre PTPE.

**Tabla 1.** Parámetros de las isotermas obtenidas de la adsorción de Pb (II) sobre PTPE.

Muestra	R1	R2	R3	Promedio
<b>Langmuir</b>				
Q <sub>m</sub> (mg/g)	256,41	384,62	322,58	321,20
K <sub>a</sub> (L/mg)	0,0741	0,0497	0,0489	0,0576
R <sup>2</sup>	0,97	0,99	0,98	0,98
L <sub>a</sub>	2,54 E-06	1,69 E-06	1,69 E-06	
<b>Freundlich</b>				
K <sub>F</sub> (mg/g)	18,5823	29,5325	29,9985	26,0378
1/n	0,6168	0,4736	0,4111	0,5005
R <sup>2</sup>	0,76	0,90	0,69	0,78

Se determinó mediante el modelo de la isoterma de Langmuir que la capacidad máxima de adsorción promedio de Pb (II) sobre PTPE, a pH óptimo, es de 321,20 mg de Pb (II)/g de PTPE (tabla 1).

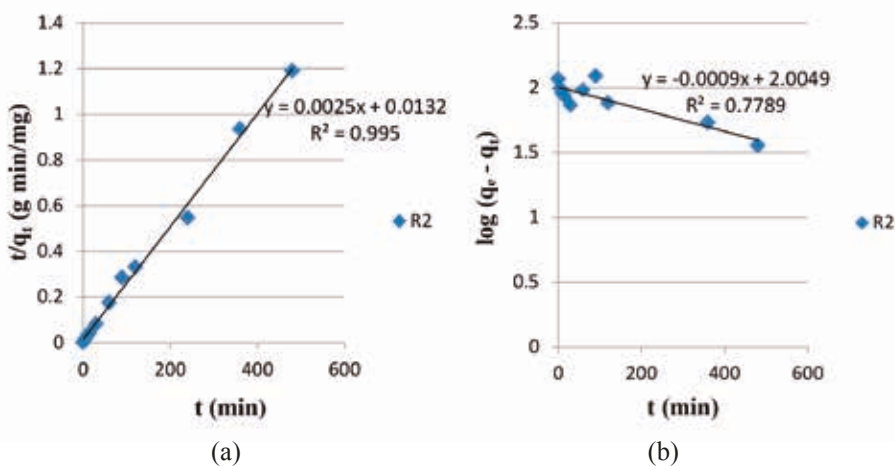
Valores de capacidad máxima de adsorción para la isoterma de Langmuir de varios adsorbentes son reportados en la tabla 2. En el cual se puede observar que la capacidad máxima de adsorción de los PTPE es superior a varios adsorbentes y es comparable al del adsorbente de raquis de plátano<sup>15</sup>.

**Tabla 2.** Comparación de capacidades máximas de adsorción de otros adsorbentes de plomo (II).

Adsorbente	Capacidad máxima de adsorción de Pb (II) (mg/g)	Referencia
Partículas coloides de Keratina	43,3	(14)
Carbón activado modificado	29,44	(8)
Residuos de vegetales	182	(5)
Cáscara de naranja pretratada	141,05	(16)
Alpeorajo (residuos de olivar)	25,247	(10)
Raquis de plátano	370,7	(15)
PTPE	321,2	Este trabajo

En el estudio cinético de adsorción se observó que los datos experimentales se ajustan al modelo cinético de pseudo-segundo orden, dado que se obtiene un coeficiente de correlación promedio de  $R^2 = 0,98$ , valor superior al obtenido por el modelo cinético de pseudo-primer orden de  $R^2 = 0,56$  (ver tabla 3). Es decir, explica mejor los datos cinéticos de adsorción de Pb (II) sobre los PTPE. Asimismo, en el modelo de pseudo-segundo orden de la tabla 3 se observa que el valor promedio de la capacidad de adsorción calculada con el modelo ( $q_{e (cal)} = 400$ ) es similar al valor promedio de la capacidad de adsorción determinada experimentalmente ( $q_{e (exp)} = 435,24$ ); lo cual corrobora la afirmación anterior. Estos resultados sugieren que el paso limitante de la velocidad puede ser el proceso de adsorción química. En la quimisorción, los metales pesados se adhieren a la superficie del adsorbente por formación de un enlace químico (generalmente covalente)<sup>13,6</sup>, es decir implica un intercambio de electrones entre el adsorbato y la superficie del material adsorbente<sup>17,6</sup>. Este comportamiento concuerda con los resultados reportados por Zhang<sup>6</sup>.

Por tanto, se observa en la figura 4 a y b, el modelo cinético de pseudo-segundo orden y de pseudo-primer orden más representativos obtenidos con los datos experimentales resultantes de la adsorción de Pb (II) sobre PTPE, respectivamente. Comparando se puede observar que el modelo de pseudo-segundo orden describe mejor el proceso de adsorción.



**Figura 4.** (a) Modelo cinético de pseudo-segundo orden y (b) Modelo cinético de pseudo-primer orden de la adsorción de Pb (II) sobre PTPE (R2).

Así también, en la tabla 3 se presentan los parámetros obtenidos del ajuste de los datos experimentales de la adsorción de Pb (II) sobre PTPE con el modelo cinético de pseudo-segundo orden y con el modelo cinético de pseudo-primer orden.

**Tabla 3.** Parámetros de los modelos cinéticos de pseudo-segundo orden y pseudo-primer orden obtenidos de la adsorción de Pb (II) sobre PTPE.

Muestra	R1	R2	R3	Promedio
<b>Pseudo 2do. orden</b>				
$K_2$ g/(mg·min)	0,0001685	0,0004735	0,0003079	0,0003166
$q_e$ (cal) (mg/g)	400	400	400	400
$q_e$ (exp) (mg/g)	449,07	439,2	417,45	435,24
$R^2$	0,9631	0,995	0,9915	0,98
<b>Pseudo 1er. orden</b>				
$K_1$ (L/min)	0,0027636	0,0020727	0,0469812	0,017273
$q_e$ (cal) (mg/g)	159,184	101,135	1068,809	443,043
$q_e$ (exp) (mg/g)	449,07	439,2	417,45	435,24
$R^2$	0,3537	0,7789	0,5352	0,56

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se concluye que los residuos de pelos del proceso de pelambre enzimático, tratados por hidrólisis ácida, son bioadsorbentes eficaces con una capacidad máxima de adsorción de 321,2 mg Pb (II)/g pelo. Asimismo, se determinó que la adsorción de Pb (II) es dependiente del pH, siendo el pH óptimo de 7 y se estableció que el comportamiento de adsorción de Pb (II) sobre residuos de pelos tratados del pelambre enzimático es descrito de forma precisa por el modelo de la isoterma de Langmuir, obteniéndose una capacidad máxima de adsorción superior a otros bioadsorbentes. Además, se determinó que el modelo cinético de pseudo-segundo orden es el que mejor se ajusta a los datos experimentales obtenidos, siendo la adsorción química el paso limitante de la velocidad de adsorción.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Fondo de Investigación y Desarrollo para la Competitividad (FIDECOM) que a través de los Proyectos de Innovación Productiva para Empresas Individuales (Convenio N°022-FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2012), a la empresa HELIANTHUS S.A.C y al Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental (CIQTOBIA) del Departamento Académico de Química de la UNALM, se logró realizar esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García MM, Zárate MA, Rojas CI. Guía técnica para la minimización de residuos en curtiembres. Lima: CEPIS; 1993.
2. CPTS (Centro de Promoción de Tecnologías Sostenibles). Guía técnica de producción más limpia para curtiembres. La Paz: Centro de Promoción de Tecnologías Sostenibles; 2003.
3. García Roig M, Ramírez PFI, Manzano MT. Bioadsorción de metales pesados de aguas ácidas de minas (y II) sobre residuos con queratina (pelos de cerdo, pluma de ave) y quitina (caparazones de crustáceos). *Ing Quím.* 2004; 184 – 204.
4. Hawkins TR. Remoción de cromo total de efluentes de la industria de galvanoplastia por adsorción con gel SOW-Fe. [Tesis para optar el título de Ingeniero Ambiental]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú; 2012.
5. Ghosh A, Collie SR. Keratinous Materials as Novel Absorbent Systems for Toxic Pollutants. *Def Sci J.* 2014; 64(3): 209-221.
6. Zhang H. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions using keratin biomaterials. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2014.
7. Larenas UC, Andrango D, Inga P. Estudio isotérmico de biosorción de plomo en aguas utilizando residuos vegetales. *La Granja.* 2008; 8(2): 3-8.
8. García Roig M, Ramírez PFI, Manzano MT. Bioadsorción de metales pesados de aguas ácidas de minas (I) sobre residuos de levaduras cerveceras. *Ing Quím.* 2003; 400: 155 – 168.
9. Goel, J.; Kadirvelu, K.; Rajagopal, Ch.; Garg, V. K. Removal of lead (II) by adsorption using treated granular activated carbon: Batch and column studies. *J Hazard Mater.* 2005; B125: 211–220.
10. Hidalgo VAR. Biosorción de plomo y cadmio mediante el aprovechamiento de residuos de madera (aserrín de pino) y extractos de algas marinas (alginato de calcio). [Tesis para obtener el título profesional de Biólogo]. Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2010.
11. Lara M. Caracterización y aplicación de biomasa residual a la eliminación de metales pesados. [Tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada; 2008.
12. Zahra N. Lead Removal from Water by Low Cost Adsorbents: A Review. *Pak J Anal Environ Chem.* 2012; 13(1): 01-08.
13. Bernard E, Jimoh A, Odigure JO. Heavy Metals Removal from Industrial Wastewater by Activated Carbon prepared from Coconut Shell. *Res J Chem Sci.* 2013; 3(8): 3-9.
14. Sekimoto Y, Okiharu T, Nakajima H, Fujii T, Shirai K, Moriwaki H. Removal of Pb (II) from water using keratin colloidal solution obtained from wool. *Environ Sci Pollut Res.* 2013; 20(9):6531-8.

15. Inga MPA. Estudio isotérmico de biosorción de cadmio, cromo, plomo y zinc en solución acuosa empleando el pinzote (raquis) de plátano (*Musa paradisiaca* L.). [Tesis para obtener el título en Ingeniería en Biotecnología de los recursos naturales]. Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana; 2012.
16. Muñoz CJC. Biosorción de plomo (II) por cáscara de naranja "*Citrus cinensis*" pretratada. [Tesis para obtener el título profesional de Químico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
17. Romero GJ, Parra VF, Cano RI, Rodríguez E, Ríos AJ, Fuentes HR, et al. Biosorción de Pb (II) por biomasa de *Agave tequilana* Weber (Agave azul). *Rev Mex Ing Quím.* 2007; 6(3): 295-300.

## **DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE FENILEFRINA CLORHIDRATO, PARACETAMOL, SALICILAMIDA, CAFEÍNA Y CLORFENIRAMINA MALEATO EN TABLETAS**

Jhonnell Samaniego Joaquín<sup>a</sup>, Gladys Arias Arroyo<sup>a</sup>

### **RESUMEN**

Se desarrolló y validó un método analítico para la cuantificación simultánea de Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida, Cafeína y Clorfeniramina maleato en tabletas utilizando la cromatografía líquida de alta precisión en fase reversa (HPLC-RP). La fase móvil consistió en Buffer fosfato pH 3,5 y longitud de onda del detector ultravioleta de 202 nm para Fenilefrina clorhidrato, 298 nm para Paracetamol, 205 nm para Clorfeniramina maleato, 262 nm para Salicilamida y Cafeína. Se logró una buena separación cromatográfica utilizando una columna L11 relleno de grupos fenilo de sílice. El tiempo de retención para cada analito fue de 8,6 para Fenilefrina clorhidrato, de 17,7 para Paracetamol, de 22,2 para Salicilamida, de 23,7 para cafeína y de 31,2 para Clorfeniramina maleato usando una elución en gradiente con acetonitrilo en proporción de un 20% como máximo a lo largo de la corrida cromatográfica. La precisión y veracidad fue mayor del 98% para los cinco activos y el tiempo de corrida fue de 40 minutos por muestra. La especificidad, linealidad, veracidad y precisión del método cromatográfico implementado permitirá su aplicación de forma rutinaria.

**Palabras clave:** Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida, Cafeína, Clorfeniramina maleato, Método analítico, cromatografía líquida de alta precisión.

## **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY BY HPLC FOR THE SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF PHENYLEPHRINE HYDROCHLORIDE, PARACETAMOL AND CHLORPHENIRAMINE MALEATE TABLETS**

### **ABSTRACT**

It is developed and validated an analytical method for the simultaneous quantification of phenylephrine hydrochloride, Paracetamol, salicylamide, chlorpheniramine maleate and Caffeine tablets using Liquid Chromatography High Resolution reversed phase (HPLC-RP).

<sup>a</sup> Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Jr. Puno 1002. Jardín Botánico. Lima. Perú. jhonnell28@hotmail.com

The mobile phase consisted of phosphate buffer pH 3.5 and wavelength of 202 nm ultraviolet detector for phenylephrine hydrochloride, 298 nm for Paracetamol, Chlorpheniramine maleate to 205 nm, 262 nm for Salicylamide and Caffeine. a good chromatographic separation using a column filled L11 phenyl silica was achieved. The retention time for each analyte was 8.6 Phenylephrine hydrochloride for, for Paracetamol 17.7, 22.2 for salicylamide, caffeine and 23.7 to 31.2 Chlorpheniramine maleate for using gradient elution with acetonitrile in proportion of 20% maximum along the chromatographic run. The precision and accuracy was greater than 98% for the 5 assets and the running time was 40 minutes per sample. Specificity, linearity, accuracy and precision of the chromatographic method implemented can be implemented routinely.

**Key words:** Phenylephrine Hydrochloride, Paracetamol, Salicylamide, Caffeine, Clorfeniramina maleate, analytical method, high precision liquid chromatography

## INTRODUCCIÓN

Es necesario adquirir conocimiento científico y tecnológico que nos permita contribuir y satisfacer las demandas de la sociedad y proporcionar solución a problemas de salud, por medio de medicamentos que en las últimas décadas son reemplazados por fármacos específicos. Los mismos que son elaborados por grandes laboratorios e industrias farmacéuticas; quienes tienen que estar atentos y cumplir con Buenas Prácticas de Manufactura y de Laboratorio, así como el control de calidad del producto fabricado es indispensable para garantizarle al consumidor un medicamento confiable y seguro.

El continuo y rápido crecimiento del mercado farmacéutico exige que los laboratorios farmacéuticos se preparen y busquen la calidad en sus productos y procesos, para poder así utilizarlo como una ventaja frente a su competencia. Lo que requiere la necesidad de obtener certificaciones que garanticen la calidad del producto, como por ejemplo la certificación ISO 9001, el mismo que requiere la validación de los métodos analíticos con el que se realiza el control de calidad de sus productos.

Diferencias entre distintas formas farmacéuticas, tipo y calidad de las materias primas empleadas por cada fabricante, hacen necesario validar la metodología para cada producto en particular. El diseño de este nuevo método sirve de guía a la industria farmacéutica para la cuantificación simultánea de cinco principios activos como materia prima y en un producto terminado; basándose en la cromatografía líquida de alta resolución como una técnica automatizada que permite analizar de forma rápida y eficiente la separación, cuantificación y detección de las muestras por medio de la identificación de los picos en los cromatogramas. Los resultados obtenidos fueron evaluados con un programa informático que integra tantos criterios de estadística y aceptación que especifica cada requisito, que permite generar resultados verídicos para asegurar y validar un método analítico de medicamentos que puede ser aprobado y autorizado.<sup>1</sup>

Con la cromatografía líquida de alta resolución que presenta ventajas sobre los métodos tradicionales se pretende obtener una técnica analítica con tiempos de análisis rápidos, separación de sustancias de mezclas complejas con alta resolución, ejecución de análisis con facilidad y exactitud, obteniendo errores relativos menores al 2%. Además, el beneficio de la tecnología, al brindar un sistema automatizado que inyecta la muestra, realiza la separación, imprime la identificación de cada pico y su concentración para luego repetir el ciclo con la muestra siguiente.<sup>2</sup>

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación simultánea de Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida, Cafeína y Clorfeniramina maleato en tabletas utilizando la cromatografía de líquida de alta precisión en fase reversa.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reactivos

Fosfato monobásico de potasio (Merck), acetonitrilo (grado HPLC, J.T. Baker), ácido fosfórico al 85% (calidad R.A. J.T. Baker), agua (HPLC).

### Material de referencia

Clorfeniramina maleato (estándar primario USP), Paracetamol (estándar primario USP), Salicilamida (estándar primario USP), Cafeína (estándar primario USP) y Fenilefrina clorhidrato (estándar primario USP),

### Equipo Cromatógrafo

Agilent Technologies 1260, equipado con bomba 1260-G1311B, auto muestreador 1260 ALS-G1329B, horno para columna 1260 TCC-G1316A y detector de arreglo de diodos 1260 DAD-G4212B. Para la adquisición y procesamiento de los cromatogramas, se empleó el programa Open lab.

### Sistema cromatográfico

Se empleó como fase móvil una solución fosfato monobásico de potasio, se ajustó a pH 3,5 con ácido fosfórico al 85%. Se empleó una columna L11 relleno de grupos fenilo de sílice de 150 x 4,6 mm 5 µm (Agilent). Se trabajó a un flujo de 0,5 mL/min hasta el minuto 7,0 y luego se aumentó el flujo a 1,0 mL/min hasta el minuto 22,0 de forma constante hasta el minuto 35,0 y luego se disminuye el flujo a 0,5 mL/min hasta el minuto 40,0. También cuenta con una elución en gradiente de acetonitrilo a los 22,0 minutos en un 20% hasta el minuto 35,0 y luego continuo con fase móvil. Se empleó detección UV a 205 nm para Clorfeniramina maleato, 202 nm para Fenilefrina clorhidrato, 298 nm para Paracetamol, 262 nm para Salicilamida y Cafeína; temperatura de la columna 30°C; volumen de inyección: 20µL.



### **Alcance del método**

La metodología desarrollada y validada se aplicó para la cuantificación simultánea de Clorfeniramina maleato, Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida y Cafeína, elaborada por mezcla de soluciones de cada uno de los componentes activos, preparadas con los respectivos estándares primarios, así como para la valoración de una mezcla de los componentes activos en una muestra conformada por Clorfeniramina maleato, Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida y Cafeína, materia prima para tabletas.

### **Preparación de la solución estándar madre**

Se pesaron 40,0 mg de Fenilefrina clorhidrato, 16,0 mg de Clorfeniramina maleato y 120,0 mg de Cafeína, se transfirieron a un matraz volumétrico de 200 mL. Se añadieron 100 mL fase móvil y se sónico por 5 minutos para luego enrasar con fase móvil.

### **Preparación de la solución estándar**

Se pesaron 30,0 mg de Salicilamida y 30,0 mg de Paracetamol y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL. Se añadieron 40 mL de fase móvil y se sónico por 5 minutos. Se transfirió 10 mL de la solución estándar madre y se enrasó con fase móvil. Se homogeneizó y filtró a través de una membrana de 0,45 $\mu$ m. Concentración aproximada de 0,02 mg/mL de Fenilefrina clorhidrato, 0,008 mg/mL de Clorfeniramina maleato, 0,3 mg/mL de Salicilamida, 0,06 mg/mL de Cafeína y 0,3 mg/mL de Paracetamol.

### **Preparación de las muestras**

Se determinó el peso promedio de 20 tabletas y se trituraron para lograr homogeneidad. Se pesó con exactitud cantidad de polvo de tabletas equivalente a 10 mg de Fenilefrina clorhidrato, 4 mg de Clorfeniramina maleato, 150,0 mg de Salicilamida, 30,0 mg de Cafeína y 150 mg de Paracetamol, de polvo de tableta y se transfirieron cuantitativamente a un volumétrico de 200 mL. Se añadieron 100 mL de fase móvil y se sónico por 15 minutos. Se transfirió 10 mL a un matraz volumétrico de 25 mL y se enrasó con fase móvil. Se homogeneizó y filtró por membrana de 0,45 $\mu$ m. Concentración aproximada de 0,02 mg/mL de Fenilefrina clorhidrato, 0,008 mg/mL de Clorfeniramina maleato, 0,3 mg/mL de Salicilamida, 0,06 mg/mL de Cafeína y 0,3 mg/mL de Paracetamol.

### **Parámetros a validar**

#### **Especificidad**

- a. Determinación de la interferencia de excipientes: Se analizó el placebo, como si fuera la muestra: El resultado de análisis del placebo no debe dar una respuesta cuantificable. Esto indica que los excipientes no interfieren en el análisis del analito.  
Se preparó una muestra de placebo con el principio activo al 100% y se efectuó el análisis respectivo comparando la respuesta del análisis con la de un patrón puro del principio activo. Se determinó la selectividad del método midiendo el grado de interferencia obtenida por la diferencia de resultados del análisis del principio activo con y sin placebo. Los resultados obtenidos deben concordar con  $\pm 2\%$  del teórico.
- b. Determinación de interferencia de productos de degradación: Se trató la muestra con los siguientes métodos de degradación artificial del analito:

- Hidrólisis alcalina; por calentamiento en baño María a 80 °C con NaOH 0.1N por 2 horas y posterior neutralización con HCl 0.1N.
- Hidrólisis ácida; por calentamiento en baño María a 80 °C con HCl 0.1N por 2 horas y posterior neutralización con NaOH 0.1N.
- Oxidación, por 2 horas en baño María con V gotas de Peróxido de Hidrógeno al 30%.
- Termólisis, por calentamiento de la droga en estufa a 80°C por 10 horas.
- Fotólisis, exposición en lámpara de luz UV por 5 días.<sup>3</sup>

### Linealidad

- a. Linealidad del sistema: Se prepararon tres curvas de calibración con cinco concentraciones correspondientes al: 50, 75, 100, 125 y 150 % de la concentración teórica.
- b. Linealidad del método: Se prepararon tres soluciones de placebo enriquecidos con los principios activos cada una por triplicado, que cubran el intervalo de trabajo y por pesadas independientes al 80, 100 y 120%. Simultáneamente con las muestras, se analizaron dos estándares de concentración conocida, al 100% de la concentración nominal de trabajo, para reportar los resultados de exactitud.<sup>4</sup>

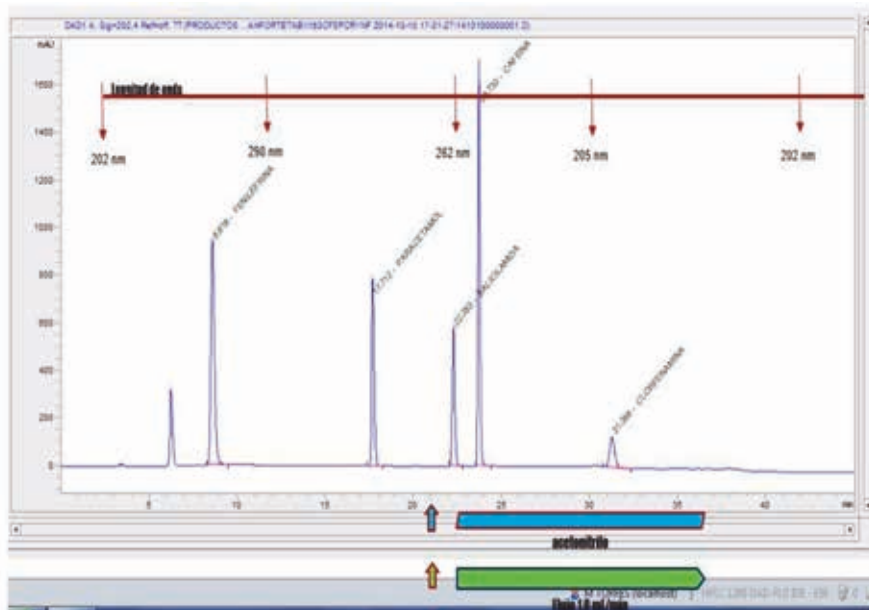
### Veracidad

Para este estudio se trabaja con las mismas muestras preparadas para la determinación de la linealidad del método.<sup>5</sup>

$$\% R = \frac{X_H - X}{X_A} \cdot 100 \quad \text{Donde:} \quad \begin{array}{l} X_H = \text{Cantidad de analito hallado} \\ X_A = \text{Cantidad del analito añadido} \end{array}$$

### Precisión

- a. Repetibilidad: Se analizaron seis muestras independientes de un mismo lote fabricado y se determinó su Desviación Estándar (S) y su Coeficiente de Variación (RSD). Teniendo como criterio de aceptación: Desviación estándar relativa (RSD)  $\leq 2\%$ .
- b. Precisión intermedia: Un segundo analista realizó, en otro día, el análisis del mismo lote empleado en el ensayo de repetibilidad usando el mismo método analítico, diferentes columnas y diferentes equipos. Se determinó la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (RSD) Teniendo como criterio de aceptación: Coeficiente de variación entre analistas:  $\leq 4\%$ .<sup>6</sup>
- c. Robustez: Se confirmó la estabilidad de la muestra, analizándola después de 24 horas a temperatura ambiente. Se consideraron tres muestras de la repetibilidad como análisis inicial y estas mismas muestras se dejan permanecer por aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente y se vuelven a correr con un estándar recientemente preparado. La influencia de estos factores se evaluará de la siguiente manera: Se calcula la desviación estándar relativa  $RSD \leq 2\%$  entre los resultados de las muestras trabajadas en las condiciones iniciales y las mismas muestras trabajadas con la nueva condición. La diferencia absoluta  $|di|$  entre los resultados de ambas condiciones debe ser:  $\leq 2\%$ .<sup>7</sup>



**Figura 1.** Cromatograma del estándar de fenilefrina clorhidrato, paracetamol, salicilamida, cafeína y clorfeniramina maleato

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Especificidad

Los resultados en la evaluación de la especificidad (tabla 1) del método permiten afirmar que es específico para cada principio activo, ya sea para muestras sin degradar como para muestras degradadas. Por lo tanto, puede emplearse para la valoración de las tabletas que contengan estos principios activos. De acuerdo con los resultados se puede afirmar que: el método es específico para la cuantificación de fenilefrina clorhidrato, paracetamol, salicilamida, cafeína y clorfeniramina maleato en polvo de tableta porque las sustancias auxiliares no lograron interferir en la determinación o cuantificación de los principios activos, en el estudio de degradación artificial de muestras correspondiente a las materias primas no hubo una disminución significativa en su concentración cuando fueron sometidas a termólisis, fotólisis, oxidación, hidrólisis básica y ácida, por lo tanto queda demostrado que el método es específico también para las muestras degradadas.

**Tabla 1.** Resultados correspondientes al estudio de Especificidad del método

	<b>Muestra sin degradar</b>	<b>Termólisis</b>	<b>Fotólisis</b>	<b>Oxidación</b>	<b>Hidrólisis ácida</b>	<b>Hidrólisis básica</b>
<b>Placebo</b>	0,0 %	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<b>Principio Activo (Fc)</b>	99,8%	98,5%	99,9%	100,0%	98,6%	98,4%
<b>Muestra (Fc + Placebo)</b>	100,2%	99,3%	100,7%	98,5%	99,4%	98,2%
<b>Principio Activo (Pa)</b>	101,2%	98,9%	100,1%	98,4%	100,2%	99,0%
<b>Muestra (Pa + Placebo)</b>	100,1%	99,7%	98,9%	99,1%	99,3%	98,4%
<b>Principio Activo (Sa)</b>	100,6%	100,5%	101,1%	99,0%	99,1%	99,7%
<b>Muestra (Sa + Placebo)</b>	101,3%	98,9%	100,4%	98,7%	98,9%	98,2%
<b>Principio Activo (Ca)</b>	101,6%	99,4%	99,6%	99,1%	98,2%	99,4%
<b>Muestra (Ca + Placebo)</b>	100,9%	101,0%	98,9%	98,7%	99,1%	100,1%
<b>Principio Activo (Cm)</b>	101,0%	99,1%	98,3%	99,5%	98,7%	98,8%
<b>Muestra (Cm +Placebo)</b>	101,1%	98,7%	99,1%	98,8%	98,5%	99,3%

Fc = Fenilefrina clorhidrato, Pa = Paracetamol, Sa = Salicilamida, Ca = Cafeína, Cm =Clorfenamina maleato

### Linealidad

Los resultados (tabla 2) permiten afirmar que el método es lineal en el intervalo de concentración evaluado porque se obtuvieron coeficientes de correlación ( $r \geq 0,99$  y coeficientes de determinación ( $r^2 \geq 0,98$ ). Los coeficientes de variación de los factores de respuesta no fueron significativamente diferentes de ( $CVf \leq 2\%$  y el intervalo de confianza del intercepto y de la pendiente estuvieron dentro de los rangos establecidos.

**Tabla 2.** Resultados correspondientes al estudio de linealidad del sistema y método

<b>Linealidad sistema</b>	<b>Fenilefrina clorhidrato</b>	<b>Paracetamol</b>	<b>Salicilamida</b>	<b>Cafeína</b>	<b>Clorfenamina maleato</b>
r					
Mayor 0,995	0,999	0,9995	0,999	0,999	0,999
r <sup>2</sup>					
Mayor 0,990	0,999	0,9991	0,999	0,999	0,999
Test ANOVA					
F <sub>exp</sub> > F <sub>tabla(4.667)</sub>	33196,157	14250,573	19515,508	85997,996	59875,273
IC-Pendiente	182,198	119,376	139,698	293,254	244,694
T <sub>exp(2.16)</sub> > T <sub>tabla</sub>					
IC-Intercepto	1,939	0,50	0,656	0,508	2,004
T <sub>exp</sub> < T <sub>tabla(2.16)</sub>					
CVf < 2%	0,65 %	1,12%	0,85%	0,63%	0,69%
<b>Linealidad Método</b>					
r					
Mayor 0,995	1,000	1,0000	0,9996	1,0000	0,9995
r <sup>2</sup>					
Mayor 0,990	1,000	1,0000	0,9991	0,9999	0,9991
Test ANOVA					
F <sub>exp</sub> > F <sub>tabla(5.591)</sub>	338453,861	330625,4	7794,823	161170,648	7605,869
IC-Pendiente	581,768	575,000	88,288	401,461	87,212
T <sub>exp</sub> > T <sub>tabla(2.365)</sub>					
IC-Intercepto	0,843	0,769	2,303	0,128	0,453
T <sub>exp</sub> < T <sub>tabla(2.365)</sub>					
CVf < 2%	0,10%	0,08%	0,85%	0,41%	0,56%

### Veracidad

Los resultados (tabla 3) permiten afirmar que el método es veraz porque se obtuvieron porcentajes de recobrados dentro del rango establecido para cada principio activo (% R = 98 a 102 %) para cada nivel de concentración y el coeficiente de variación total recobrado menores al 2% (CVR total  $\leq 2$ ).

**Tabla 3.** Resultados correspondientes al estudio de veracidad

	<b>R</b>	<b>CVR total</b>
Fenilefrina clorhidrato	99,20%	1,13%
Paracetamol	99,15%	1,01%
Salicilamida	98,86%	0,86%
Cafeína	99,36	0,51%
Clorfenamina maleato	100,47%	1,10%

### Precisión

- a. Repetibilidad. El método analítico cumple con el criterio de aceptación correspondiente, porque para el nivel de concentración al 100% de cada principio activo se evaluaron seis muestras, obteniéndose la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV)  $\leq 2,0$  %. (tabla 4)

**Tabla 4.** Resultados correspondientes al estudio de repetibilidad

	<b>S</b>	<b>CV</b>
Fenilefrina clorhidrato	1,63	0,91%
Paracetamol	1,16	1,19%
Salicilamida	0,12	0,79%
Cafeína	0,37	0,36%
Clorfenamina maleato	0,03	0,67%

- b. Precisión intermedia. Los resultados indican (tabla 5) que el método es preciso, independientemente del día en que se realice el análisis y de la experiencia del analista que lo ejecute; porque se obtuvo un coeficiente de variación total para cada principio activo (CV total)  $\leq 4$  %.

**Tabla 5.** Resultados correspondientes al estudio precisión intermedia

	<b>CV total</b>
Fenilefrina clorhidrato	1,26%
Paracetamol	0,87%
Salicilamida	0,78%
Cafeína	0,86%
Clorfenamina maleato	0,93%

- c. Robustez. Los resultados (tabla 6) permiten afirmar que el método es robusto porque no se encontraron diferencias en las tres muestras evaluadas al 100% al inicio y después de 24 horas a temperatura ambiente. La influencia de estos factores se evaluó obteniendo una desviación estándar relativa (DSR)  $\leq 2\%$

**Tabla 6.** Resultados correspondientes al estudio de robustez.

	<b>DSR</b>
Fenilefrina clorhidrato	0,17%
Paracetamol	0,03%
Salicilamida	0,54%
Cafeína	0,41%
Clorfenamina maleato	0,22%

## CONCLUSIONES

Se logró desarrollar el método analítico propuesto, obteniéndose una buena separación cromatográfica utilizando una columna L11 relleno de grupos fenilo de sílice. El tiempo de retención para cada analito fue de 8,6 para Fenilefrina clorhidrato, de 17,7 para Paracetamol, de 22,2 para Salicilamida, de 23,7 para cafeína y de 31,2 para Clorfeniramina maleato usando una gradiente de flujo con acetonitrilo en proporción de un 20% como máximo a lo largo de la corrida cromatográfica que fue de 40 minutos por muestra.

El método desarrollado es específico ya que no se detectó interferencia con la matriz, ni con los productos de degradación.

El método es lineal en el intervalo de concentración del 50% hasta 150% de cada principio activo, siendo la muestra 100% igual a 0,02mg/mL de Fenilefrina clorhidrato, 0,008 mg/mL de Clorfeniramina maleato, 0,3 mg/mL de Salicilamida, 0,06 mg/mL de Cafeína y 0,3 mg/mL de Paracetamol. Obteniendo coeficientes de correlación ( $r$ )  $\geq 0,99$  y coeficientes de determinación ( $r^2$ )  $\geq 0,98$ . Además los coeficientes de variación de los factores de respuesta (CVf) fueron menores de 2 % y el intervalo de confianza del intercepto y de la pendiente estuvieron dentro de los rangos establecidos

El método es veraz ya que su capacidad analítica de dar resultados lo más cercano al valor real queda demostrado al no haber diferencia significativa entre la recuperación media de 99,20% para Fenilefrina clorhidrato, 99,15% para Paracetamol, 98,86% para Salicilamida, 99,36% para Cafeína y 100,47% para Clorfenamina maleato.

El método es preciso, ya que el grado de concordancia que existe entre las pruebas realizadas al 100% de concentración nos permite obtener resultados repetitivos obteniendo una desviación estándar (S) y coeficientes de variación (CV) menores al 2% y además podemos decir que el método es reproducible porque en los resultados de la precisión intermedia se obtuvieron coeficientes de variación total (CV total) para cada principio activo menores al 4%.

El método es robusto, ya que no hay diferencia significativa con los resultados obtenidos trabajando las mismas muestras al inicio y después de 24 horas con desviación estándar relativa (DSR) de 0,17% para Fenilefrina clorhidrato, 0,03% para Paracetamol, 0,54% para Salicilamida, 0,41% para Cafeína y 0,22% para Clorfenamina maleato.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vallejo GF. Validación de la metodología analítica de cuantificación de clorfeniramina maleato, dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en dos jarabes comerciales por cromatografía líquida de alta resolución [Tesis de grado Químico Farmacéutico]. Guatemala: Universidad de San Carlos; 2009.
2. Contreras RJ, Jardines LY, Fonseca M, Águila B. Validación de un método analítico por HPLC para la cuantificación del principio activo en tabletas de Controfilina-200. Revista CENIC. Ciencias Químicas. 2005; 36(2):74-81.
3. Trejos CN, Tello EM. Validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación de sulfadiazina de plata en crema. Rev Colomb Cienc Quím Farm. 2008; 37(2): 191-199.
4. Neelima K, Rajendra Y. Desarrollo y Validación de un Método Analítico para determinación simultánea de Hydralazina en Di nitrato de Isosorbida en granel y tabletas por HPLC. World J Pharm Pharm Sci. 2014; 5(4): 1290-1294.
5. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human use. (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Ginebra: ICH; 2005.
6. The United States Pharmacopeia Convention. Farmacopea de los Estados Unidos de América. USP 38 NF 33. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention; 2015.
7. Collado CA, Moreno LO, García PC, Gómez CM, Barrios M, Begué M. Validación del método analítico para el control de la calidad y estudio de estabilidad de ribavirina inyectable 100 mg/mL. Rev cub farm. 2010; 44(4): 485-493.

## ELABORACIÓN, CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA Y ESTUDIO MOTRIZ DE UN ACTUADOR TRICAPA

Saúl Bertel Hoyos<sup>a</sup>, Jairo Segura Bermúdez<sup>b</sup>, Álvaro Arrieta<sup>c</sup>, Yamid Núñez<sup>a</sup>

### RESUMEN

En este trabajo se presenta la obtención de una biopelícula con propiedades semiconductoras, desarrollada a partir de almidón de yuca dopada con perclorato de litio y plastificantes como glicerina y glutaraldehído, que le proporcionaron propiedades eléctricas y mecánicas necesarias para generar movimiento. Se empleó la síntesis electroquímica de Polipirrol (PPy) con el fin de obtener las capas externas para la constitución de un actuador tricapa (PPy/biopelícula/PPy) capaz de responder a estímulos eléctricos y funcionar en el aire. El dispositivo fue sometido a potenciales recurrentes que generaron la óxido/reducción del PPy permitiendo el movimiento del actuador. Posteriormente, con el objeto de describir algunas de sus propiedades fue caracterizado mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), voltametría cíclica, técnicas muy usuales en la actualidad para el estudio de este tipo de materiales. Por otro lado, se realizó un estudio motriz del músculo artificial tricapa, teniendo en cuenta las respuestas a pulsos eléctricos.

**Palabras clave:** Biopelícula, Polipirrol, actuador tricapa, músculo artificial.

## ELABORATION, ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION AND MOTION STUDY OF A THREE-LAYER ACTUATOR

### ABSTRACT

In this work is presented the development of a biofilm with semiconducting properties, derived from cassava starch and plasticizers such as glycerin and glutaraldehyde and doped with lithium perchlorate, which provided the electrical and mechanical properties needed to achieve the desired motion. Electrochemically synthesized polypyrrole (PPy) was used in order to obtain the outer layers to constitute a three-layer actuator (PPy / biofilm / PPy) able to react to electrical stimulus and operate in air. Differents recurrent potentials were administered to the device generating the oxidation and reduction processes in the PPy, easing the movement of the actuator as a whole. In order to describe some of its properties, the actuator was characterized by electrochemical impedance spectroscopy and cyclic

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Básicas, Fundación Universitaria los Libertadores, Carrera 16 # 63a-68, Bogotá, 111211, Colombia, [sdbertelh@libertadores.edu.co](mailto:sdbertelh@libertadores.edu.co).

<sup>b</sup> CEN CtiSAP, Universität Hamburg, Hamburg 20095, Alemania

<sup>c</sup> Departamento de Biología y Química, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia

voltammetry. Furthermore, a study of the trilayer muscle deflection angle was performed, considering the responses to electrical pulses.

**Key words:** Biofilm, Polypyrrole, actuator threelayer, artificial muscle.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha venido investigando intensamente en la identificación y desarrollo de materiales y dispositivos capaces de imitar el funcionamiento y desempeño de los músculos naturales. Teniendo en cuenta su naturaleza y funcionamiento, se requieren materiales capaces de conducir iones y electrones. El rango del pulso eléctrico tiene que ser del orden de los mV, que es el intervalo de potenciales que usan los músculos naturales ( $\approx 175$  mV). Deben experimentar una variación de volumen asociada a cambios conformacionales en su estructura. Además deben tener una estructura molecular similar, por lo que estos materiales deben tener componentes macromoleculares. De esta manera, a la hora de buscar sistemas artificiales capaces de imitar el funcionamiento de los músculos naturales, los más apropiados han sido los sistemas electroquímicos basados en polímeros conductores<sup>1</sup>.

En la última década, se han desarrollado muchas alternativas para músculos artificiales, como los geles poliméricos, pero sin duda los polímeros conductores son los que han surgido como la mejor opción. Los primeros actuadores que recibieron el nombre de músculo artificial se basan en polímeros conductores<sup>2</sup>, también denominados dispositivos electroquímio-mecánicos por involucrar una reacción electroquímica en la conversión a energía mecánica.

El principio básico de este dispositivo es la oxidación/reducción electroquímica de los polímeros conductores, que lleva asociado un cambio de volumen del material. El cambio de volumen (propiedad mecánica) está asociado al grado de oxidación y éste a la carga consumida en el proceso electroquímico: propiedad electroquímica. En el proceso de oxidación, partiendo de un polímero en estado neutro, las elevadas interacciones polímero-polímero hacen que la estructura sea muy compacta. Al oxidarse y extraerse electrones de la cadena, las cargas positivas generadas en cadenas vecinas provocan fuertes repulsiones electrostáticas. Mediante variaciones conformacionales las cadenas se mueven, la estructura se abre y los contraiones de la disolución penetran en el polímero para mantener la electroneutralidad. Con los iones también penetran moléculas del disolvente y por tanto el polímero se expande, otorgándole al músculo en su movimiento la capacidad de ser detenido en cualquier momento o ser invertido desde cualquier momento.

Con el paso de los años, se han propuesto diferentes tipos de músculos artificiales. La primera generación se inició en 1955 por Katchalski y se basaba en geles poliméricos no conductores electrónicos. La dificultad que se presentaba en ese entonces era que los geles reaccionaban a muy elevados potenciales ( $>20$  V), necesitaban dos electrodos metálicos auxiliares para crear el campo eléctrico requerido para su movimiento, trabajaban mediante fenómenos electrocinéticos (electroforesis y electro-osmosis), y eran denominados dispositivos electrocineto-mecánicos y su velocidad de movimiento fue relativamente baja.

La segunda generación de músculos artificiales la constituyen los basados en polímeros conductores electrónicos intrínsecos, que fueron patentados en 1992. Con esta generación, se ha acercado a los músculos naturales en varios aspectos fundamentales: trabajan a bajo potencial (100 mV – 2 V), los músculos naturales a 60 -150 mV, que es el potencial del pulso nervioso, el mismo material es conductor electrónico, iónico y es actuador y sensor de las condiciones de trabajo<sup>1</sup>.

Para transformar los movimientos conformacionales moleculares electroasistidos, en movimientos macroscópicos, en el Laboratorio de Electroquímica de la Facultad de Químicas de San Sebastián, se ideó y patentó un dispositivo de doble capa, similar a los termómetros de bilamina metálica. Al electrodo metálico, recubierto de una película de PPy electrogenerada de 15  $\mu\text{m}$ , se le adhirió una película polimérica comercial no conductora, de 30  $\mu\text{m}$ . La bilamina (PPy/película adherente) se desprendió del electrodo y se empleó como nuevo electrodo en una disolución acuosa.

Tradicionalmente, los músculos artificiales de la segunda generación que se reportan, funcionan en una solución acuosa electrolítica, la cual permite el paso de iones hacia y desde el polímero conductor. En pocas ocasiones se ha reportado músculos artificiales basados en polímeros conductores capaces de moverse en aire, sin embargo, los reportados sustituyen a la solución electrolítica por un polímero conductor sintético, o por un gel polimérico.

Recientemente, un equipo de investigadores de la Universidad Nacional de Taiwán fabricó un músculo artificial a partir de células de cebolla, se notó que al fluir la corriente las células de cebolla se doblan con un voltaje 0 V - 50 V y se estiran con un voltaje 50 V - 1000 V, como un músculo “natural”. Este músculo que funciona en aire solo se desplazó una distancia de 1 mm y como allí se menciona los voltajes son elevados comparados con los voltajes referidos a los de los músculos naturales, sin embargo representa un gran aporte al estudio y evolución de los músculos artificiales<sup>3</sup>.

No obstante, en este trabajo se presenta un dispositivo con características de músculo artificial, respondiendo a pulsos eléctricos del orden de unos cuantos voltios (0,5 V- 4 V), es el primer músculo artificial en el mundo que emplea un polímero de almidón de yuca capaz de responder a estímulos eléctricos en el aire, barriendo distancias angulares de hasta 83,5°.

## PARTE EXPERIMENTAL

En el desarrollo experimental se llevaron a cabo varias etapas, inicialmente, la obtención de la biopelícula, luego la síntesis del PPy y por último la obtención del dispositivo triacapa.

### **Obtención de la biopelícula conductora**

Para la obtención de la biopelícula conductora, primero se procesó la yuca o cassava (*Manihot esculenta*) haciendo uso de las operaciones básicas de lavado, pelado, rallado, filtrado, decantado, secado y molienda para la obtención de almidón.

Para elaborar las películas de almidón primero se vertió 100 ml de agua milli-Q con pH 9,0, ya que se ha comprobado que con pH básicos las moléculas de amilopectina se despliegan facilitando la entrada a plastificantes en la estructura<sup>4</sup>. Luego se agregó el almidón a temperatura ambiente, se dejó en agitación constante durante 15 min hasta tener una mezcla homogénea. Una vez obtenida dicha mezcla, se vertieron los siguientes reactivos: glicerina (GLY), glutaraldehído (GLU) y perclorato de litio (LP) que proporcionaron las propiedades mecánicas de flexibilidad y conductoras respectivamente, e inmediatamente se aumentó la temperatura hasta 70 °C durante 15 minutos, posteriormente se depositó en un recipiente de teflón y se llevó a una incubadora por un periodo de 48 horas a una temperatura de 70 °C. Pasado este periodo, se retiró de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente por 24 horas. Seguidamente la Síntesis del PPy.

### **Síntesis de PPy**

Las películas de PPy se obtuvieron mediante la técnica de síntesis electroquímica. Para ello, se preparó una mezcla de LP y pirrol en acetonitrilo, la que finalmente se colocó en un beaker de 50 ml. Luego, empleando un sistema constituido por tres electrodos, un electrodo de trabajo (EW) en el que se depositó el polímero (polipirrol), un electrodo de referencia (ER) de Calomel saturado, y un electrodo auxiliar (EA) o contra electrodo, ubicado a los lados del EW. Como EW y EA, se usaron láminas de acero inoxidable de 2 x 2,5 cm. Posteriormente, se aplicó un potencial de 0,8 V durante un tiempo de 2500 s mediante un potenciostato/galvanostato Parstat 2263 para generar el crecimiento de las capas de PPy en el EW.

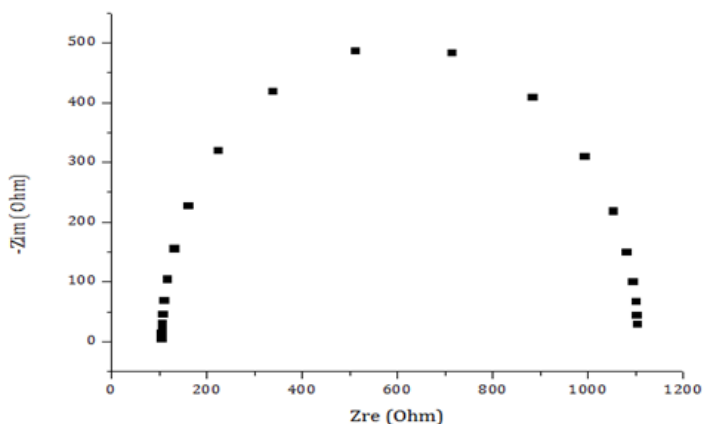
### **Obtención del tricapa**

Se realizó un corte de 4,5 cm<sup>2</sup> (3 cm x 1,5 cm) de biopelícula conductora, y se colocó sobre una de las caras del PPy que se encontraba en el EW. Luego de igual forma se procedió para retirar la segunda capa de PPy, obteniéndose así el constituyente tricapa (PPy/Biopolímero conductor/PPy).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

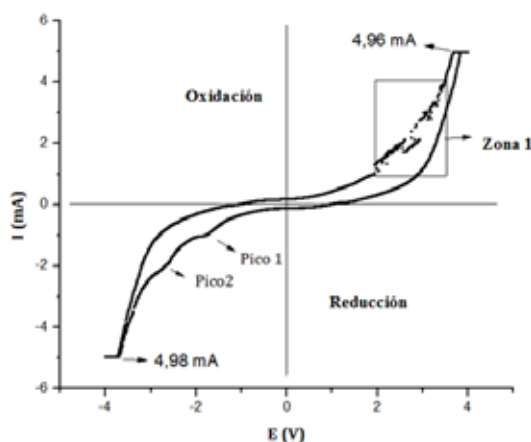
### **Espectroscopía de impedancia electroquímica y voltametría cíclica**

La resistividad iónica del dispositivo desarrollado se determinó a partir de su espectro de impedancia, para ello, se tomó 1 cm<sup>2</sup> del tricapa PPy/Biopolímero/PPy, que fue conectado previamente en medio de dos placas de acero inoxidable y posteriormente al potenciostato/galvanostato Parstat 2263, Princeton Applied Research, la conductividad encontrada a partir del diagrama de Nyquist (figura 1) fue de 3,022 x 10<sup>-5</sup> S.cm<sup>-1</sup>, ubicándolo en el rango de los semiconductores<sup>5,6,7</sup>. La celda electroquímica consistió, en un sistema donde el tricapa queda en medio de dos placas de acero inoxidable, un lado de la placa se conectó al EA previamente cortocircuitado con el ER y el otro lado se conectó al EW.



**Figura 1.** Diagrama de Nyquist del tricapa PPy/Biopolímero Conductor/PPy. El potencial de referencia fue el OCP (Open Circuit Potential) con un valor de  $-0,022$  V.

Por otro lado, se realizó un análisis con la técnica de voltametría cíclica (VC) del dispositivo tricapa con área de  $4,5$   $\text{cm}^2$ . Este estudio se llevó a cabo mediante 4 rangos de potencial, de  $-1$  V a  $1$  V,  $-2$  V a  $2$  V,  $-3$  V a  $3$  V y  $-4$  V a  $4$  V. En los pulsos de  $-1$  V a  $1$  V y  $-2$  V a  $2$  V no se observó proceso redox. En tanto que para los últimos rangos de potencial ( $-3$  V a  $3$  V y  $-4$  V a  $4$  V), en la onda de oxidación se observaron bifurcaciones a  $2$  V y  $3$  V, con corrientes de  $2$  y  $3$  mA (figura 2), además de dos picos bien definidos (pico 1 y pico 2), correspondientes a dos procesos de reducción del  $\text{PPy}^1$ , las bifurcaciones pueden deberse a un fuerte proceso de oxidación de las películas de  $\text{PPy}$  asociada con ruido electrónico. La celda electroquímica empleada en este sistema es similar a la usada en el análisis de EIS.



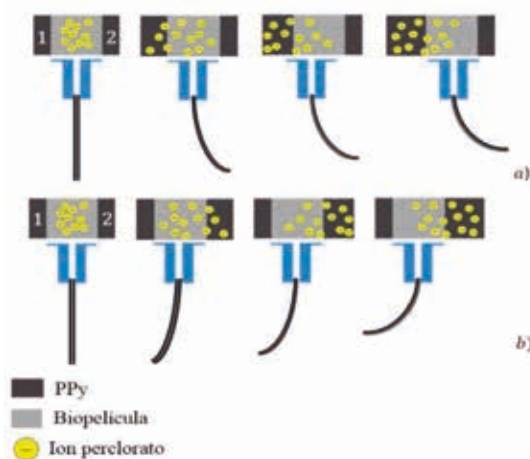
**Figura 2.** Voltagrama del tricapa en el rango de potencial de  $-4$  V a  $4$  V, medida a  $0,1$   $\text{V s}^{-1}$ . El ER se cortocircuitó con el EA y se conectó a un lado de la placa de acero inoxidable y EW al otro terminal, el tricapa permaneció en medio de las dos placas.

### Estudio motriz del tricapa

Por otra parte, las técnicas de VC e impedancia, permitieron conocer que el dispositivo desarrollado es conductor de la electricidad y en él ocurren procesos de óxido/reducción característicos en los músculos naturales. Estos procesos de oxidación y reducción en las capas externas de PPy se traducen en un cambio conformacional de su volumen generando movimiento. Los cambios de volumen en el tricapa son debidos al desplazamiento iónico producido durante la reacción electroquímica.

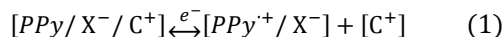
En la figura 3 se presenta un esquema de movimiento del tricapa que responde a estímulos eléctricos en el aire, en donde se presentan las distribuciones de los iones perclorato durante el proceso redox.

Al aplicar un pulso galvánico recurrente en los extremos del tricapa, el dispositivo se desplaza en sentido antihorario (figura 3a) y horario (figura 3b). Esto es: en el sentido horario la cara 1 de PPy se reduce (disminuye su volumen), mientras que la cara 2 se oxida (aumenta su volumen), por lo contrario para el sentido antihorario se tiene una reducción en la cara 2 y una oxidación en la cara 1. Cabe resaltar que la oxidación corresponde al ingreso de los iones perclorato, provenientes de la matriz polimérica del biopolímero de almidón de yuca (electrolito sólido) hacia la cara de PPy. El mecanismo de intercambio iónico no ha sido actualmente definido con claridad, sin embargo, en la literatura<sup>8,9</sup> han sido propuestos algunos mecanismos de intercambio, uno de los más aceptados explica las bases de la respuesta electroquímica, según lo representado por las ecuaciones 1 y 2.

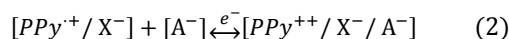


**Figura 3.** Esquema del movimiento del tricapa PPy/Biopolímero/PPy en el aire, las caras del dispositivo han sido numeradas como 1 y 2.

En el primer proceso de óxido/reducción, por razones de electronegatividad, la película de *PPy* se comporta como un intercambiador de cationes ( $C^+$ ):



La reacción redox que conduce al segundo proceso de óxido/reducción puede ser descrito como sigue:



Donde  $X^-$  y  $A^-$  representan los contraiones y los aniones, respectivamente. En este caso la electroactividad del *PPy* hace que la película se comporte como un intercambiador de iones. Esto quiere decir que los aniones de perclorato, provenientes del biopolímero de almidón de yuca que corresponde a un electrolito sólido, le proporcionan al *PPy* los iones necesarios para mantener su electroneutralidad. La estructura del polímero adyacente (*PPy*) es oxidada (pierde  $e^-$ ) se abre, facilitando el paso a los iones, el proceso se invierte de manera continua dando como resultado un comportamiento electroquimiomecánico, típico de los músculos naturales.

En cuanto al análisis realizado, respecto al movimiento electroquimiomecánico del tricapa, se estudiaron los desplazamientos angulares en función del tiempo como respuesta a los pulsos eléctricos, obteniéndose así velocidades angulares de  $\omega=0,039$  rad/s en el sentido horario y  $\omega=0,025$  rad/s en el sentido antihorario, barriéndose ángulos de  $52,2^\circ$  y  $31,3^\circ$ , respectivamente, lo cual corresponde a una amplitud de  $83,5^\circ$ .

## CONCLUSIONES

Las proporciones empleadas de aglutinantes y el método experimental para la obtención de la biopelícula conductora, otorgaron propiedades de adherencia favorables para la construcción del tricapa, en donde la biopelícula se usó para desprender el *PPy* del EW, además, la conductividad calculada fue de  $3,022 \times 10^{-5}$  S.cm<sup>-1</sup> que la ubica en el rango de los semiconductores.

Con la técnica VC, se evidenció que el actuador tricapa, obedece a los procesos de oxidación/reducción, en donde las capas de *PPy* al ser oxidadas y/o reducidas producen un cambio significativo de su volumen que se traduce en un movimiento fluido del actuador en el aire en ambas direcciones.

Se encontraron algunas similitudes entre el músculo artificial desarrollado y los músculos naturales, entre las cuales se resalta el control sobre las velocidades y dirección de movimiento, la capacidad de mantenerse estable en un punto al cesar la corriente además de operar a bajos voltajes (<4V).



El dispositivo desarrollado se constituye como la quinta generación de músculos artificiales, debido a que funciona en aire, empleando un biopolímero conductor a base de almidón de yuca que actúa como puente intercambiador de iones entre las capas externas de *PPy*. Este dispositivo es el primero, reportado en el mundo que utiliza el almidón de cassava y es capaz de responder a estímulos eléctricos en el aire.

### AGRADECIMIENTO

A la Fundación universitaria Los Libertadores, por su apoyo en la realización de esta investigación.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cortés Montañez MT. Músculos artificiales de tricapa, caracterización y diseño de dispositivos. [Tesis doctoral]. Universidad del país Vasco: Ciencias Químicas; 2002.
2. Otero TF. Polímeros conductores: Síntesis, propiedades y aplicaciones electroquímicas. *Rev Iber Pol.* 2003; 4: 1-37.
3. Chien Chu C, Wen Pin S, Pei Zen C et al. Onion artificial muscles. *Appl Phys Lett.* 2015; 106: 1-5. [Citado el 15 de sep 2015]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4917498>.
4. Parra DF, Tadini CC, Ponce P, Lugão AB. Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films. *Carbohydr Polym.* 2004; 58: 475-481.
5. Arrieta Almario AA. Diseño de una red de sensores electro químicos inespecíficos basados en polímeros conductores para el análisis sensorial de vinos. [Tesis doctoral]. Universidad de Valladolid; 2004.
6. Díaz M, Rojas Giraldo A, Vera E, Cortés Montañez MT. Síntesis electroquímica y caracterización eléctrica de polímeros conductores a partir de pirrol. *Rev Col Fis.* 2005; 37: 357-360.
7. Arrieta Almario AA, Jaramillo A. Bioplásticos eléctricamente conductores de almidón de yuca. *Rev Col Fis.* 2014; 5: 42-49.
8. Arrieta Almario AA, Tarazona Cáceres RL. Study of kinetic formative and the electrochemical behavior of polypyrrole films. *J Chil Chem Soc.* 2009; 54: 14-19. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072009000100004>.
9. Otero TF. Los polímeros conductores como materiales biomiméticos. *Bol Soc Esp Cerám y Vidrio.* 1997; 36: 230-237.

## FUNCIONALIZACIÓN DE TEXTILES DE ALGODÓN CON NANOPARTÍCULAS DE ZnO<sub>2</sub>

Carmen Uribe Valenzuela<sup>a</sup>, Elsa Roca Meneses<sup>a</sup>, Marco Brañez Sánchez<sup>a</sup>,  
Jessica Álvarez Alayo<sup>a</sup>, L. Esmeralda Román Mendoza<sup>a,b</sup>, Dora Maurtua Torres<sup>c</sup>,  
José L. Solís Veliz<sup>d</sup> y Mónica M. Gómez León<sup>\*d</sup>

### RESUMEN

Se sintetizó nanopartículas de peróxido de zinc (ZnO<sub>2</sub>) por el método sol-gel y se las caracterizó estructural y morfológicamente. Las nanopartículas sintetizadas fueron suspendidas en un medio acuoso para funcionalizar tejidos textiles de algodón, obteniendo textiles con propiedades antimicrobianas. La funcionalización fue mediante el proceso de impregnación sobre tejido seco, haciendo uso del equipo denominado Foulard de impregnación. Las muestras textiles impregnadas fueron analizadas microbiológicamente frente a cepas de bacterias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) y *Escherichia coli* (ATCC 25922), posterior a estos análisis se realizaron controles de solidez, análisis de sus propiedades físicas y control del color. De los análisis realizados se concluye que los textiles funcionalizados con nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> poseen propiedades antimicrobianas. Además las propiedades físicas y las solidez del textil no son afectadas luego del proceso de funcionalización.

**Palabras clave:** Nanopartículas, funcionalización, textiles antimicrobianos, control de calidad textil, análisis microbiológico.

## FUNCTIONALIZATION OF COTTON TEXTILES WITH ZnO<sub>2</sub> NANOPARTICLES

### ABSTRACT

Zinc peroxide (ZnO<sub>2</sub>) nanoparticles were synthesized by sol-gel method and characterized structurally and morphologically. The synthesized nanoparticles were suspended in aqueous medium to functionalize cotton textile fabrics, getting textiles with antimicrobial properties.

---

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

<sup>b</sup> Escuela de Artes, Ciencias y Humanidades, Universidad de São Paulo, Av. Arlindo Bettio 1000, Ermelino Matarazzo, São Paulo, Brasil.

<sup>c</sup> Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias y Filosofía, Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú

<sup>d</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú mgomez@uni.edu.pe

The functionalization was by impregnation process over dry woven, making use of equipment called impregnation Padder. The impregnated textile samples were microbiologically analyzed against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) strains. Subsequently, fastness control, physical properties studies and color control analysis were performed over the textiles. We concluded that the textiles functionalized with  $\text{ZnO}_2$  nanoparticles have antimicrobial properties, moreover, physical properties and textile fastness are not affected after the functionalization process.

**Key words:** Nanoparticles, functionalization, antimicrobial textile, textile quality control, microbiological analysis.

## INTRODUCCIÓN

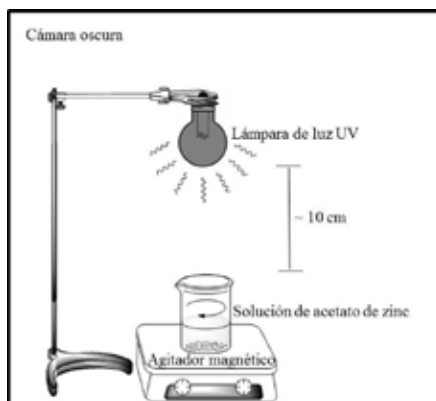
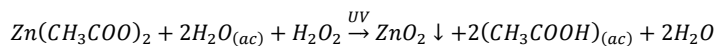
Actualmente, en la industria textil se viene investigando y desarrollando productos con propiedades diferentes a los que normalmente tienen, estos nuevos productos son denominados textiles polifuncionales o textiles inteligentes<sup>1-5</sup>, podemos mencionar a los textiles que tienen propiedades ignífugas<sup>6-8</sup>, de protección de rayos UV<sup>6,9</sup>, antimicrobianos<sup>10-14</sup> e incluso otros que funcionan como biosensores.<sup>15-17</sup> Los nuevos acabados textiles con propiedades específicas no afectan la calidad estética del textil, tal es el caso de los acabados antimicrobianos a base de nanomateriales.<sup>2,18-20</sup> Entre los nanomateriales más prometedores con propiedades antimicrobianas y antivirales son las nanopartículas metálicas de Ag,<sup>21</sup> Cu,<sup>22</sup> Au,<sup>23</sup> Zn,<sup>24, 25</sup> entre otros, que presentan aumento de su actividad química debido a la gran relación de superficie a volumen y la estructura de la superficie cristalográfica.<sup>26</sup>

El uso de nanopartículas de peróxido de zinc ( $\text{ZnO}_2$ ) se ha visto como un medio eficaz para detener enfermedades infecciosas de la piel e infecciones de heridas, ello debido a las propiedades antibacterianas y antifúngicas que posee.<sup>27-32</sup> En el presente artículo reportamos la síntesis y caracterización de nanopartículas  $\text{ZnO}_2$ , así como los resultados obtenidos del control de solidez, control de color, análisis microbiológicos y pruebas físicas de los textiles funcionalizados con nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$ . Las evaluaciones de los textiles se realizaron empleando normas técnicas estándares internacionales, así como también técnicas de caracterización como microscopía electrónica para los estudios morfológicos.

## PARTE EXPERIMENTAL

En la parte experimental de la investigación se realizó la síntesis de las nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$  y su caracterización por técnicas estructurales y morfológicas. Luego, estas nanopartículas fueron empleadas para la funcionalización de los materiales textiles.

Las nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$  fueron obtenidas por el método sol-gel<sup>33</sup> partiendo de una solución de acetato de zinc y peróxido de hidrógeno bajo radiación UV.<sup>28</sup> El esquema de síntesis de nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$  se muestra en la figura 1 y la reacción que se postula para el proceso de síntesis es:<sup>34,35</sup>



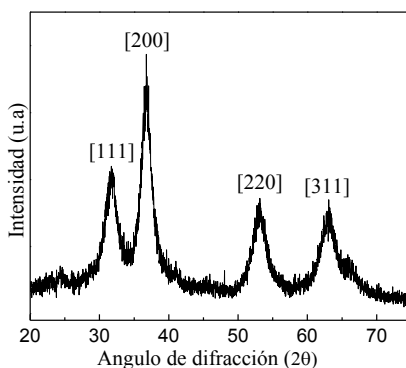
**Figura 1.** Esquema de la síntesis de nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> por radiación UV.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados experimentales de la caracterización estructural y morfológica de las nanopartículas de ZnO<sub>2</sub>, así como los resultados de la evaluación de calidad y microbiológico de los textiles funcionalizados con dichas nanopartículas.

### Difracción de Rayos X

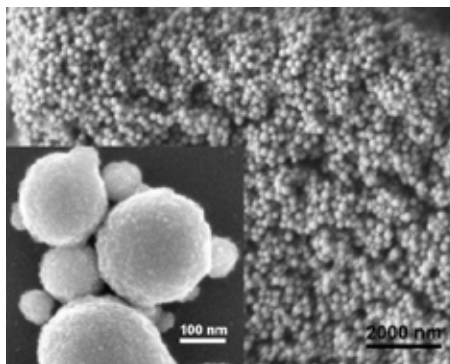
La caracterización estructural de las nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> se realizó empleando el método de difracción de rayos X, para ello se empleó el difractómetro Rigaku Miniflex II Desktop, con fuente de radiación de CuK $\alpha$ 1 ( $\lambda=0.15045$  nm) a 30 kV, 20mA y velocidad de barrido de 3°/min. La figura 2 muestra el difractograma obtenido del polvo de ZnO<sub>2</sub>. Se pueden observar 4 picos para los ángulos 31,7°, 36,8°, 53,1° y 63,2° asignados a las reflexiones [111], [200], [220] y [311] del correspondientes a la estructura cúbica del ZnO<sub>2</sub>,<sup>34</sup> respectivamente. El tamaño del dominio cristalino fue calculado empleando la Fórmula de Scherrer<sup>36</sup> la cual arrojó un valor de 4 nm.



**Figura 2.** Difractograma de rayos X de las nanopartículas ZnO<sub>2</sub>.

### Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

La caracterización morfológica de las nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$  se realizó por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo utilizando el microscopio electrónico JEOL JSM-7401F operado a 5kV. La figura 3 muestra las micrografías electrónicas de las nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$ , se pueden observar conglomerados esféricos de tamaños de diámetro entre  $\sim 80$  y 200 nm los cuales están conformados por dominios cristalinos de tamaños muchos más pequeños que no se pueden identificar en la imagen.

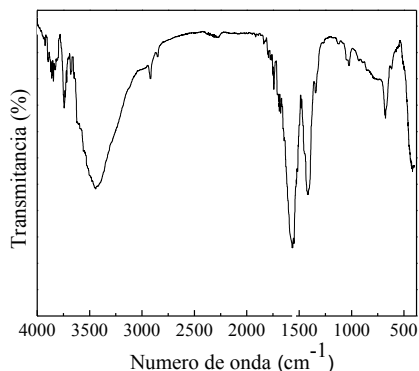


**Figura 3.** Micrografías electrónicas de barrido de emisión de campo de las nanopartículas  $\text{ZnO}_2$ .

### Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

Los análisis de espectroscopía de infrarroja de las nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$  se llevaron a cabo en un espectrofotómetro IR Prestige-21 Shimadzu en el rango de 4000 a  $400\text{ cm}^{-1}$ , empleando pastillas de bromuro de potasio (KBr) que contuvieron las nanopartículas y usando como referencia el KBr puro.

En la figura 4 se observa el espectro de transmisión, en el cual los picos corresponden a procesos de absorción. La banda que se presenta claramente en el rango de  $3400\text{ cm}^{-1}$  a  $3600\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la absorción del modo *stretching* del enlace O-H- que puede provenir de las moléculas de agua adsorbidas superficialmente a las nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$ .<sup>34,37</sup> Alrededor de  $3000\text{ cm}^{-1}$  se observan pequeños picos característicos al modo *stretching* del enlace C-H del grupo metilo ( $-\text{CH}_3$ ).<sup>34</sup> Entre  $1250\text{ cm}^{-1}$  y  $1750\text{ cm}^{-1}$  los picos formados corresponden a los modos de vibración del acetato de zinc<sup>38</sup> lo que podría indicar que permaneció algo de reactante sin reaccionar. La banda a longitudes de onda menores a  $500\text{ cm}^{-1}$  se atribuye al modo de vibración *stretching* del enlace Zn-O.<sup>39,40</sup>



**Figura 4.** Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier de nanopartículas ZnO<sub>2</sub>.

### Funcionalización del textil con nanopartículas de ZnO<sub>2</sub>

Para la funcionalización de los textiles con nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> se utilizaron suspensiones coloidales a 20, 40 y 60 g/l, donde el medio líquido fue agua destilada y alcohol isotridecílico al 2%.

El proceso de funcionalización se realizó por el método de impregnación en seco, haciendo uso del Foulard de impregnación. El proceso consistió en pasar el textil a través de la suspensión coloidal, contenida en un recipiente, para luego ser exprimido entre dos rodillos que se encontraron a una presión de 4 bar, todo ello con la finalidad de lograr una absorción uniforme y controlada a lo largo y ancho del textil. Este proceso suele expresarse en forma de porcentaje (%) de absorción, siempre con relación al peso seco del textil, por lo cual es indispensable pesar el textil antes y después del proceso de impregnación. Este % de absorción es denominado *pick up* y se expresa como la cantidad de producto aplicado a la tela en función a la base seca de esta y se calcula según la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso seco}} \times 100 \quad (1)$$

El *pick up* obtenido normalmente durante este trabajo se encontró entre 70 y 80%. Posteriormente para eliminar el agua remanente en el textil fue llevado a una estufa para ser secado a una temperatura de 120°C por un tiempo de 3 min.

### Control de calidad

En este trabajo se realizaron las pruebas físicas, controles de solidez y control de color del textil no funcionalizado (TNF) y a los textiles funcionalizados con suspensiones de 20 g/l (TF20), 40 g/l (TFs40) y 60 g/l (TF60) de nanopartículas de ZnO<sub>2</sub>.

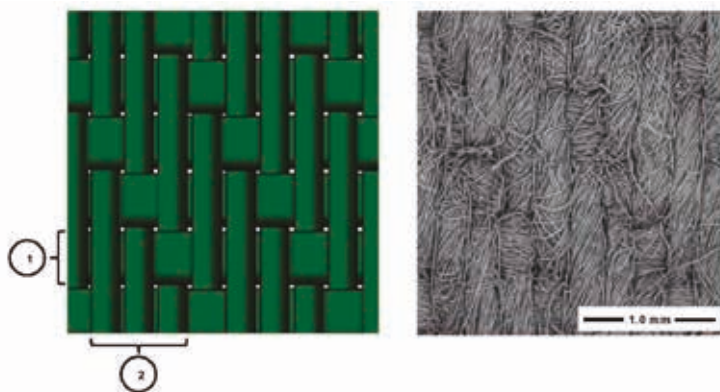
### Pruebas físicas

La determinación de las pruebas físicas de un textil consiste en especificar completamente las características mecánicas que este posee. En el presente trabajo se desarrollaron las siguientes

evaluaciones del tejido: ligamento, densidad, gramaje, resistencia y título del hilo que lo forma. Todas estas evaluaciones se realizaron siguiendo normas técnicas internacionales.

### Ligamento del tejido

El ligamento de un tejido es la manera de entrecruzar los hilos (urdimbre) con las pasadas (trama) y cuyo conjunto de evoluciones se repite constantemente a lo largo y ancho del tejido. Los ligamentos fundamentales son: tafetán, sarga y raso. En el presente trabajo el ligamento se determinó con la norma NTP 231.141:1985: 2010. En la figura 5, se observa claramente que el ligamento de los textiles empleados es una sarga 3/1, lo que significa que la evolución del hilo es 3 tomados (hilo encima de la pasada) y 1 dejado (hilo debajo de la pasada).



**Figura 5.** (a) Esquema del ligamento sarga 3/1 en donde (1) hilos de trama y (2) hilos de urdimbre. (b) Micrografía electrónica de barrido del tejido utilizado en el presente trabajo

### Densidad del tejido

Es la cantidad de hilos por unidad de longitud del tejido. El proceso para su determinación consistió en contar el número de hilos que están dentro de una pulgada lineal, haciendo uso del instrumento denominado Cuentahilos. La densidad del tejido fue determinada con la norma ASTM D3775:2012.

La tabla 1 muestra los resultados para los textiles funcionalizados con suspensiones de diferentes concentraciones y del textil no funcionalizados (TNF). Claramente se observa que la cantidad de hilos en el sentido de la urdimbre permanece constante en todas las muestras de tela, mientras que en el sentido de los hilos de trama hay un incremento de la cantidad de hilos (encogimiento en esa dirección) para los textiles funcionalizados. Este ligero encogimiento observado es una propiedad típica del algodón, por lo que no podemos con certeza atribuirlo al proceso de funcionalización y al mecanismo que podrían estar jugando las nanopartículas en él.

**Tabla 1.** Resultados de la densidad del tejido de los textiles funcionalizados con suspensiones de diferentes concentraciones de nanopartículas, y del textil no funcionalizado (TNF).

Muestras textiles	N° Hilos/pulgada	
	Urdimbre	Trama
TNF	116	57
TF20	116	59
TF40	116	59
TF60	116	60

### Gramaje del tejido

Este parámetro da información de la cantidad de masa textil por unidad de área ( $\text{g/m}^2$ ). Para su determinación, se usó el instrumento denominado Sacabocado, que corta el tejido en forma circular con un área de  $100 \text{ cm}^2$ . El gramaje del tejido fue determinado haciendo uso de la norma ASTM D3776 – 09a:2013.

La tabla 2 presenta los resultados obtenidos para las muestras textiles analizadas. Se observa que, el gramaje de las muestras se incrementa con el aumento de la concentración de la suspensión de nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$ . Este resultado podríamos fácilmente esperarlo considerando que al aumentar la concentración de nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$  en la suspensión, aumenta la presencia de ellas en el textil y por lo tanto la masa de este se incrementa.

**Tabla 2.** Resultados del gramaje de los textiles funcionalizados con suspensiones de diferentes concentraciones de nanopartículas, y del textil no funcionalizado (TNF).

Muestras textiles	Gramaje ( $\text{g/m}^2$ )
TNF	265.87
TF20	272.93
TF40	275.00
TF60	280.99

### Resistencia del tejido

Este parámetro representa la carga en libras o kilogramos que soporta el textil por unidad de longitud, para la evaluación de la resistencia a la rotura de los tejidos se utilizó el Método Grab y fue determinado con la norma ASTM D5034 – 09:2013.

Los resultados de resistencia de los tejidos analizados se muestran en la tabla 3, donde se observa que en el sentido de la urdimbre, la relación resistencia/cantidad de nanopartículas es inversa. Así, la muestra textil funcionalizada con una suspensión de concentración igual a  $60 \text{ g/l}$  tiene la menor resistencia. En el sentido de la trama se tiene un aumento de la resistencia



para todos los textiles funcionalizados. Este efecto podemos interpretarlo en conexión con los resultados obtenidos para la densidad del tejido, donde hay aumento de hilos de trama, lo que le conferiría mayor resistencia en esa dirección.

Por otro lado, en dirección de los hilos de urdimbre se observa que el textil funcionalizado con la suspensión de concentración 20 g/l presenta un aumento de la resistencia. Pero este valor disminuye sostenidamente a medida que aumenta la presencia de nanopartículas en el textil, esto podría deberse a que el  $\text{ZnO}_2$  posiblemente afecte químicamente a la fibra.

**Tabla 3.** Resultados de la resistencia de los textiles funcionalizados con suspensiones de diferentes concentraciones de nanopartículas, y del textil no funcionalizado (TNF).

Muestras textiles	Unidades (kg/m)	
	Urdimbre	Trama
TNF	745.41	608.92
TF20	813.65	673.23
TF40	801.84	666.67
TF60	633.86	717.85

#### Título del hilo

Es una característica técnica que relaciona la masa por unidad de longitud, o viceversa, del hilo. Para su determinación, en este trabajo se empleó la norma ASTM D1059 – 01:2010 haciendo uso del sistema inglés (Ne).<sup>41</sup>

La tabla 4 muestra los resultados de título del hilo de las muestras textiles analizadas donde se observa una mínima diferencia entre los títulos de los hilos de urdimbre de todas las muestras, aproximadamente entre los valores de 0.04 y 0.14. El título de los hilos de trama tiene la tendencia a disminuir conforme se incrementa la concentración de suspensión de  $\text{ZnO}_2$  impregnada al tejido textil. La leve disminución del título de los hilos de trama podría deberse al incremento de la presencia de las nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$ , ya que estas al adherirse en la superficie de los hilos hacen que aumenten el peso y por tanto que el título sea más grueso.

**Tabla 4.** Título del hilo en sistema inglés (Ne) para los textiles funcionalizados con suspensiones de diferentes concentraciones de nanopartículas, y del textil no funcionalizado (TNF).

Muestras textiles	Ne	
	Urdimbre	Trama
TNF	19.29	11.82
TF20	19.38	11.62
TF40	19.25	11.43
TF60	19.11	11.42

## Solideces

La solidez es la resistencia que presenta un textil teñido a variar o perder su color al ser sometido a la acción de un determinado agente, pudiendo dar lugar a la degradación del color y/o a la descarga sobre otros textiles. El agente es la causa capaz de producir la modificación visual del color en los textiles teñidos, estampados o con acabados específicos.

En el presente trabajo las solideces se evaluaron desarrollando normas técnicas para determinar la respuesta del textil al lavado, al frote y al sudor. La evaluación de solideces, se realizó en la cabina de luces con la luz D65 incidiendo en ángulo de 45°, además de emplear escalas de grises estandarizadas por la Asociación Americana de Químicos y Coloristas Textiles (AATCC del término en inglés *American Association of Textile Chemists and Colorists*), las cuales son: Escala de Grises para Cambio de Color (EGCC) y Escala de Grises para Transferencia de Color (EGTC), estas valoraciones muestran el cambio y transferencia del color luego que el material textil es sometido a una evaluación de solidez, la valoración se da según los grados 5, 4-5, 4, 3-4, 3, 2-3, 2, 1-2, 1, donde el grado 5 es el de mayor solidez (no hay cambio o transferencia de color) y 1 el de más baja solidez (hay un gran cambio o una gran transferencia de color).

## Solidez al lavado

Determinada con la norma ISO 105/C06:2006, que consiste en lavar con una solución de detergente sin blanqueador óptico los tejidos textiles cosidos a un testigo multifibra en presencia de billas de acero, todo ello dentro de vasos de acero que giran en los ejes de la máquina denominada Launderómetro por un período de 45 min.

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos luego de la evaluación de la solidez al lavado, donde se puede observar que el TNF y los textiles funcionalizados con diferentes concentraciones de suspensiones de nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> presentan el mismo grado de valoración en transferencia de color sobre el testigo de multifibra. Con respecto al cambio de color, se observa que el TNF y los textiles funcionalizados con suspensiones de nanopartículas con concentraciones de 20g/l y 40 g/l no presentan cambio de color notorio (grado 4 – 5, 5), mientras el textil funcionalizado con una concentración de 60g/l, presenta un cambio de color moderado (grado 3), esto se justifica por las evaluaciones visuales realizadas luego de la funcionalización de los textiles, donde a mayor concentración el textil se torna más claro.

**Tabla 5.** Resultados de la evaluación de solidez al lavado para los textiles funcionalizados con suspensiones de diferentes concentraciones de nanopartículas, y del textil no funcionalizado (TNF) según Norma ISO 105/C06:2006.

Evaluación	Testigo multifibra DW	Muestras textiles			
		TNF	TF20	TF40	TF60
Transferencia de color	Di-acetato	4-5	4-5	4-5	4-5
	Algodón blanqueado	4-5	4	4	4
	Poliamida	4	4-5	4	4-5
	Poliéster	4-5	4-5	4-5	4-5
	Acrílico	5	5	4-5	4-5
	Lana	4-5	4	4-5	4
Cambio de color		4-5	4-5	4-5	3

### Solidez al frote

La solidez al frote fue determinada con la norma AATCC 8:2013, que consiste en sujetar con un dispositivo de sujeción el textil a evaluar en la base del equipo denominado Frotómetro que posee una lija de agua, de tal manera que la dirección diagonal del textil se encuentre en dirección paralela al movimiento de la clavija del equipo. En la Tabla 6 se presentan los datos para los textiles evaluados. Se observa que la concentración de nanopartículas interfiere mínimamente en la solidez al frote en seco. Respecto al frote húmedo, los textiles funcionalizados y el TNF presentan el mismo resultado, no importando la concentración de la suspensión de nanopartículas aplicada, esto debido a que la funcionalización a diferentes concentraciones afecta mínimamente y del mismo modo al tejido textil.

**Tabla 6.** Resultados de la evaluación de solidez al frote para los textiles funcionalizados con suspensiones de diferentes concentraciones y del textil no funcionalizado (TNF) según la Norma AATCC 8:2013.

Evaluación	Testigo multifibra DW	Muestras textiles			
		TNF	TF20	TF40	TF60
Transferencia de color	Di-acetato	4-5	4-5	4-5	4-5
	Algodón blanqueado	4-5	4	4	4
	Poliamida	4	4-5	4	4-5
	Poliéster	4-5	4-5	4-5	4-5
	Acrílico	5	5	4-5	4-5
	Lana	4-5	4	4-5	4
Cambio de color		4-5	4-5	4-5	3

### Solidez al sudor

La estabilidad no satisfactoria del color a la transpiración o sudor se debe al corrimiento o migración del color o al cambio de color del material teñido. Por otra parte, se puede producir un corrimiento sin ningún cambio aparente de color o viceversa, o puede haber tanto corrimiento como cambio de color.

La solidez al sudor fue determinada con la norma ISO 105/E04:2006, que consiste en coser el tejido textil a una multifibra que luego serán sumergidos por 30 min en soluciones ácidas y alcalinas los cuales simulan el sudor del cuerpo humano. Después son colocadas entre placas de resina acrílica ubicadas en el equipo de Transpiración, posterior a ello son introducidas en la estufa por 4 h a 37°C. En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos de solidez de los tejidos al sudor, donde claramente se muestra que la presencia de las nanopartículas en los textiles funcionalizados no ocasiona transferencia ni cambio de color, es decir presentan una excelente solidez al sudor.

**Tabla 7.** Resultados de la evaluación de solidez al sudor para los textiles funcionalizados con suspensiones de diferentes concentraciones y del textil no funcionalizado (TNF) según Norma ISO 105/E04:2006.

Evaluación	Testigo multifibra DW	Muestras textiles			
		TNF	TF20	TF40	TF60
Transferencia de color	Di-acetato	5	5	5	5
	Algodón blanqueado	5	5	5	5
	Poliamida	5	5	5	5
	Poliéster	5	5	5	5
	Acrílico	5	5	5	5
	Lana	5	5	5	5
Cambio de color		5	5	5	5

### Control de color

La evaluación del cambio de color producido luego de la funcionalización a las diferentes concentraciones de la suspensión de nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> al textil teñido, fue realizada haciendo uso del equipo Datacolor 550 TM, Datacolor Spectrum TM. Para el cálculo de las diferencias de color se hizo uso del programa Datacolor TOOLS. La Tabla 8 muestra los resultados de diferencia de color entre el TNF y los textiles funcionalizados con suspensiones de diferentes concentraciones de nanopartículas de ZnO<sub>2</sub>. Todas las muestras textiles fueron analizadas con iluminante luz de día (D65) y con el observador patrón de 10° normalizado por la Comisión Internacional de Iluminación (CIE del término en francés *Commission Internationale de L'Eclairage*). Donde DL, Da, Db, DC y DH es la diferencia entre el TNF y el textil funcionalizado del punto de claridad sobre el que se encuentran los matices neutros de gris del blanco al negro, medida de rojo/verde, medida de amarillo/azul, medida de la saturación (opaco, intenso) y la medida del matiz o color, respectivamente. De los valores de diferencia de color, se puede apreciar que a mayor concentración de la suspensión de nanopartículas, aumenta la claridad del textil es decir el textil se ve más blanco.

**Tabla 8.** Diferencias de color de las muestras textiles funcionalizadas con suspensiones de diferentes concentraciones de nanopartículas.

Muestras textiles	$\Delta E$ CIELab	DL	Da	Db	DC	DH
TF20	1.81	-0.10	-1.73	-0.55	1.64	0.77
TF40	2.16	1.80	0.66	-0.98	-0.78	0.89
TF60	4.01	3.09	1.88	-1.73	-2.08	1.49

### Análisis microbiológico de los textiles

Los análisis microbiológicos de las telas se realizaron según la norma AATCC 100:2012. El cual consiste en colocar trozos del tejido textil sobre una placa Petri estéril, luego son impregnados con 1 ml de los microorganismos a ensayar a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml). Un trozo de tela es sembrado inmediatamente (tiempo cero) y el otro a las 24 h de incubación a 37°C. Después de la impregnación e incubación con la cepa a estudiar, el textil se somete a un lavado con 100 ml

de agua destilada estéril. Luego el agua de lavado es diluido desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ , posterior a ello son sembrados en medio Agar Trypticase de Soya e incubados por 24 h a  $37^\circ\text{C}$ , para finalmente realizar las lecturas correspondientes.

Las Tablas 9 y 10 muestran los resultados obtenidos del conteo bacteriano en ufc/ml para la evaluación microbiológica del textil con *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, respectivamente. El textil no funcionalizado (TNF) y el textil funcionalizado con una suspensión de concentración de 20g/l de nanopartículas  $\text{ZnO}_2$ , no presentan porcentaje de reducción bacteriana, es decir los microorganismos se han desarrollado.

Los textiles funcionalizados con suspensiones de concentraciones de 40 y 60g /l, muestran actividad antimicrobiana después de 24 h de contacto frente a las dos cepas de bacterias evaluadas, con una reducción de su crecimiento del 100%

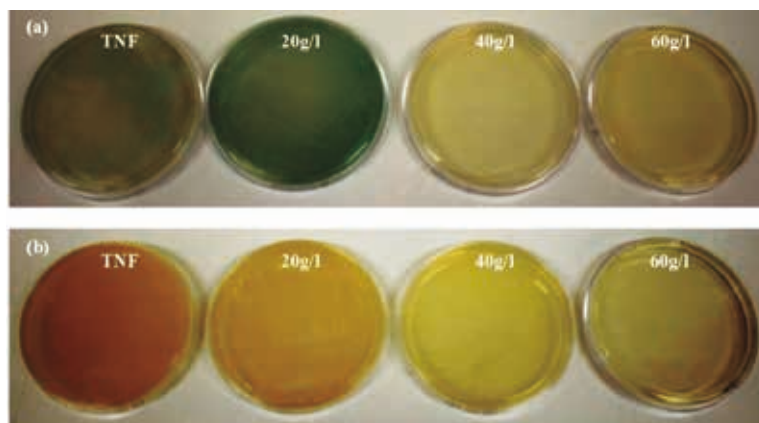
**Tabla 9.** Resultados del porcentaje de reducción bacteriana del textil no funcionalizado (TNF) y textiles funcionalizados con diferentes concentraciones de las suspensiones de nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$  para la *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), según Norma AATCC 100:2012.

Muestras textiles	Conteo bacteriano (ufc/ml)		Porcentaje reducción (%)
	Tiempo cero	Tiempo 24h	
TNF	560x10	>100,000	No hay reducción
TF20	640x10	>100,000	No hay reducción
TF40	180x10	0	100%
TF60	280x10	0	100%

**Tabla 10.** Resultados del porcentaje de reducción bacteriana del textil no funcionalizado (TNF) y textiles funcionalizados con diferentes concentraciones de las suspensiones de nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$  para la *Escherichia coli* (ATCC 25922), según Norma AATCC 100:2012.

Muestras textiles	Conteo bacteriano (ufc/ml)		Porcentaje reducción (%)
	Tiempo cero	Tiempo 24h	
TNF	140x10	>100,000	No hay reducción
TF20	1040x10	>100,000	No hay reducción
TF40	1370x10	0	100%
TF60	350x10	0	100%

La figura 6, muestra el conteo bacteriano realizado en las placas Petri para el textil no funcionalizado y los textiles funcionalizados. La pigmentación verdosa es característica del desarrollo bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* que se aprecia claramente en el TNF y el textil funcionalizado con la suspensión de concentración 20g/l. Mientras que para el caso de la *Escherichia coli* se observa una ligera opacidad para las mismas muestras. Por otro lado para los textiles funcionalizados con suspensiones de mayores concentraciones (40 y 60 g/l) no se desarrolla crecimiento de las cepas bacterianas.

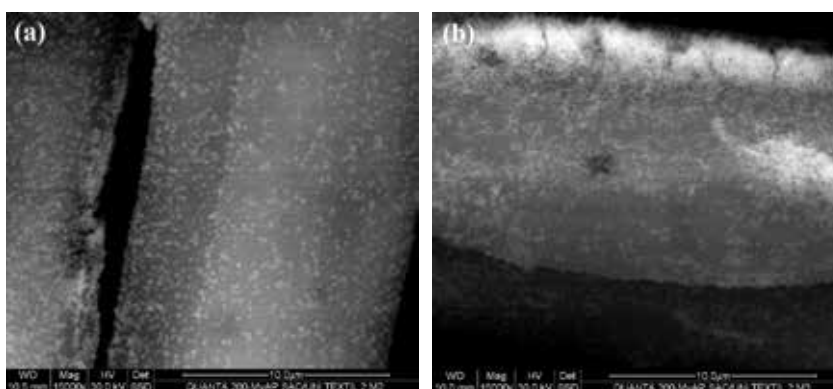


**Figura 6.** Imágenes de las placas Petri correspondientes al textil no funcionalizado (TNF) y a los textiles funcionalizados a las concentraciones de suspensiones de nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> indicadas. (a) Corresponde a las placas analizadas para *Pseudomonas aeruginosa* y (b) *Escherichia coli*.

### Morfología del tejido textil

La información de la ubicación y distribución de las nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> en la superficie de las fibras textiles es de gran importancia para entender el comportamiento antimicrobiano que estas presentan, por ello su morfología fue estudiada por microscopía electrónica de barrido empleando un microscopio FEI Quanta 200 operado a 30 kV en el modo imagen.

La figura 7, presenta las micrografías electrónicas de barrido para las muestras funcionalizadas con diferentes concentraciones de la suspensión de ZnO<sub>2</sub>, (a) 20 g/l y (b) 40 g/l. Las nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> se encuentran distribuidas en la superficie de la fibra. En el caso del textil obtenido con una suspensión de concentración 20 g/l, se observa una distribución uniforme, mientras que para el textil funcionalizado con una concentración dos veces mayor, se aprecian también conglomerados de las nanopartículas.



**Figura 7.** Micrografías electrónicas de barrido para el textil funcionalizado con una suspensión de nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> de (a) 20 g/l y (b) 40 g/l.

## CONCLUSIONES

Las nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$  fueron sintetizadas por el método de sol-gel empleando radiación UV durante su síntesis. Por DRX y FTIR se comprobó la presencia de  $\text{ZnO}_2$  el cual presentó dominios cristalinos de  $\sim 4\text{nm}$ , que se presentó en forma de conglomerados esféricos de tamaños que variaban entre  $\sim 80$  a  $200\text{ nm}$ .

El textil funcionalizado con nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$  presentó buenas solidesces al lavado doméstico, frote y sudor, además se incrementaron los valores de las propiedades físicas, también se originó un cambio de color sobre el textil original pero este cambio de color era previsible y es usual en todas las aplicaciones de acabados textiles en la industria previéndose el mismo en el desarrollo del color. A la concentración de  $20\text{ g/l}$  de suspensión de nanopartículas de  $\text{ZnO}_2$  no hubo reducción del crecimiento de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, mientras que para las suspensiones de concentraciones mayores a  $40\text{ g/l}$  se redujeron al 100% el crecimiento de bacterias de las cepas indicadas.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Dra. Gladys Ocharan y al Dr. Francisco Paraguay por los análisis de microscopía electrónica de barrido. Dos de nosotros (L.E.R.M. y M.M.G.L.) agradecen al Instituto general de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería (IGI-UNI) por la beca otorgada.

El presente trabajo fue desarrollado bajo la financiación recibida por el Instituto General de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería (IGI-UNI) y el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad del Ministerio de Producción del Perú (PNICP).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jovic D. Functional finishing of textiles with responsive polymeric systems. In Jovic D. Surface modification systems for creating stimuli responsiveness of textiles. Enschede: University of Twente; 2010; 37-59.
2. Baurley S. Interactive and experiential desing in smart textile products and applications. Pers Ubiquit Comput. 2004; 8: 274-281.
3. Horrocks AR, Anand SC. Handbook of technical textiles. Cambridge: Woodhear Publishing Ltd.; 2000. p 2-23.
4. Kiekens P, Van der Burght E, Kny E, Uyar T, Milašius R. Functional textiles - from research and development to innovations and industrial uptake. Autex Res J. 2014; 14(4): 219-226.
5. Van Langenhove L, Hertleer C. Smart clothing: a new life. Int J Cloth Sci Tech. 2004; 16(1-2): 63-72.

6. Pan N, Sun G. Functional textiles for improved performance, protection and health. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.; 2011.p. 360-396.
7. Horrocks AR. Flame retardant challenges for textiles and fibres: New chemistry versus innovatory solutions. *Polym. Degrad Stabil.* 2011; 96(3): 377-392.
8. Mohsin M, Ahmad SW, Khatri A, Zahid B. Performance enhancement of fire retardant finish with environment friendly bio cross-linker for cotton. *J Clean Prod.* 2013; 51: 191-195.
9. Scott RA. Textiles for protection. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.; 2005. P. 151-215.
10. Uribe C, Maurtua D, Roca E, Brañez M, Román LE, Alvarez J, et al. Obtención de textiles bactericidas. *Mundo Textil: Asociación Peruana de Técnicos Textiles.* 2014; 127: 26-32.
11. Rajendran S. Advanced textiles for wound care. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.; 2009. p.153-195.
12. Schindler WD, Hauser PJ. Chemical finishing of textiles. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.; 2004. p. 165-174.
13. Bobbarala V. Antimicrobial agents. Rijeka: InTech; 2012. p. 387-406.
14. Román Mendoza LE. Estudio experimental del acabado textil antimicrobiano textil con nanopartículas: obtención, aplicación y control. [Tesis para optar el título de profesional]. Lima: Universidad Nacional de Ingeniería; 2014.
15. Van Langenhove L. Smart textiles for medicine and healthcare: Materials, systems and applications. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.; 2007. p. 26-147.
16. Bartels VT. Physiological comfort of biofunctional textiles. *Curr Probl Dermatol.* 2006; 33:51-66.
17. Tao X. Smart fibres, fabrics and clothing. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.; 2001. p. 174-197.
18. Abraham GA, Caracciolo PC, Miró Specos M, Escobar G, Hermida L. Nanotecnología para textiles funcionales. *Rev SAM.* 2012; 1: 3-46.
19. White WC, Monticello RA. Antimicrobial performance of medical textiles. *AEGIS Environ.* 2002: 1-14.
20. Dastjerdi R, Montazer M, Shahsavan S. A new method to stabilize nanoparticles on textile surfaces. *Colloids Surf A.* 2009; 345(1-3): 202-210.
21. Zhang F, Wu X, Chen Y, Lin H. Application of silver nanoparticles to cotton fabric as an antibacterial textile finish. *Fiber Polym.* 2009; 10(4): 496-501.
22. Cioffi N, Torsi L, Ditaranto N, Tantillo G, Ghibelli L, Sabbatini L, et al. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chem Mater.* 2005; 17(21): 5255-5262.
23. Ahmad T, Wani IA, Manzoor N, Ahmed J, Asiri AM. Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles. *Colloids Surf B.* 2013; 107: 227-234.
24. Çakir BA, Budama L, Topel Ö, Hoda N. Synthesis of ZnO nanoparticles using PS-b-PAA reverse micelle cores for UV protective, self-cleaning and antibacterial textile applications. *Colloids Surf A.* 2012; 414: 132-139.
25. Gordon T, Perlstein B, Houbara O, Felner I, Banin E, Margel S. Synthesis and



- characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. *Colloids Surf A*. 2011; 374(1-3): 1-8.
26. Stevanovic M, Bracko I, Milenkovic M, Filipovic N, Nunic J, Filipic M, et al. Multifunctional PLGA particles containing poly(l-glutamic acid)-capped silver nanoparticles and ascorbic acid with simultaneous antioxidative and prolonged antimicrobial activity. *Acta Biomater*. 2014; 10(1): 151-162.
  27. Makumire S, Chakravadhanula V, Köllisch G, Redel E, Shonhai A. Immunomodulatory activity of zinc peroxide ( $\text{ZnO}_2$ ) and titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ) nanoparticles and their effects on DNA and protein integrity. *Toxicol Lett*. 2014; 227(1): 56-64.
  28. Colonia R, Solís JL, Gómez M. Bactericidal, structural and morphological properties of  $\text{ZnO}_2$  nanoparticles synthesized under UV or ultrasound irradiation. *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol*. 2014; 5(1): 015008.
  29. Meleney FL. Zinc Peroxide in Surgical Infections. *Am J Nurs*. 1941; 41(6): 645-649.
  30. Meleney FL, Harvey HD. The Combined use of zinc peroxide and sulfanilamide in the treatment of chronic, undermining, burrowing ulcers due to the micro-Aerophilic Hemolytic Streptococcus. *Ann Surg*. 1939: 1067-1094.
  31. Sunderland D, Binkley S. The use of zinc peroxide in infected tumors and radiation necrosis. *Case Memorial hospital*. 1939; 35(5): 606-616.
  32. Johnson BA, Meleney FL. The antiseptic and detoxifying action of zinc peroxide on certain surgical aerobic, anaerobic and micro-aerophilic bacteria. *Ann Surg*. 1939; 109(6): 881-912.
  33. Brinker CJ, Scherer GW. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. London: Academic Press Limited; 1990.
  34. Escobedo-Morales A, Esparza R, García-Ruiz A, Aguilar A, Rubio-Rosas E, Pérez R. Structural and vibrational properties of hydrothermally grown  $\text{ZnO}_2$  nanoparticles. *J Cryst Growth*. 2011; 316: 37-41.
  35. Han X, Liu R, Chen W, Xu Z. Properties of nanocrystalline zinc oxide thin films prepared by thermal decomposition of electrodeposited zinc peroxide. *Thin Solid Films*. 2008; 516: 4025-4029.
  36. Cullity BD. *Elements of X-ray diffraction*. Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Company Inc.; 1956. p. 149-173.
  37. Drmosh QA, Gondal MA, Yamani ZH, Saleh TA. Spectroscopic characterization approach to study surfactants effect on  $\text{ZnO}_2$  nanoparticles synthesis by laser ablation process. *Appl Surf Sci*. 2010; 256: 4661-4666.
  38. Ibarra L, Marcos-Fernández A, Alzorri M. Mechanistic approach to the curing of carboxylated nitrile rubber (XNBR) by zinc peroxide/zinc oxide. *Polymer*. 2002; 43: 1649-1655.
  39. Gondal MA, Drmosh QA, Yamani ZH, Saleh TA. Synthesis of  $\text{ZnO}_2$  nanoparticles by laser ablation in liquid and their annealing transformation into ZnO nanoparticles. *Appl Surf Sci*. 2009; 256: 298-304.
  40. Cheng S, Yan D, Chen JT, Zhuo RF, Feng JJ, Li HJ, et al. Soft-template synthesis and characterization of  $\text{ZnO}_2$  and ZnO hollow spheres. *J Phys Chem C*. 2009; 113(31): 13630-13635.
  41. Saville BP. *Physical testing of textiles*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.; 2000. p. 77-114.

## **DESARROLLO DE LOS ÍNDICES DE SUSCEPTIBILIDAD ELECTROFÍLICA Y NUCLEOFÍLICA**

Said Figueredo López<sup>\*a</sup>, Manuel Páez Meza<sup>a</sup>, Francisco Torres Hoyos<sup>b</sup>

### **RESUMEN**

Dos nuevos índices de reactividad fueron desarrollados dentro del marco conceptual de la Teoría del Funcional de la Densidad. Estos nuevos descriptores, denominados índice de susceptibilidad electrofílica e índice de susceptibilidad nucleofílica, fueron probados para el reproducir las tendencias de reactividad química de series de quinonas halogenadas e indoles 5-sustituídos, respectivamente. Los sistemas moleculares mencionados fueron tratados computacionalmente utilizando el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d). Para estos sistemas, los descriptores propuestos aquí mostraron ser más apropiados que otros descriptores ya conocidos, tales como el poder electro-donador, poder electro-aceptador y el comúnmente utilizado índice de electrofiliidad.

**Palabras clave:** reactividad química, índice de susceptibilidad electrofílica, índice de susceptibilidad nucleofílica, comput conceptual.

## **DEVELOPMENT OF THE ELECTROPHILIC AND NUCLEOPHILIC SUSCEPTIBILITY INDICES**

### **ABSTRACT**

Two new reactivity indices were developed within the conceptual framework of the Density Functional Theory. These new descriptors, called electrophilic susceptibility index and nucleophilic susceptibility index, were tested to reproduce the chemical reactivity trends of series of halogen-substituted quinones and 5-substituted indoles, respectively. The above mentioned molecular system were computationally treated by using the B3LYP/6-31G(d) level of theory. For these systems, the proposed descriptors showed to be more appropriate than other descriptors currently known such as the electrodonating power, the electroaccepting power and the popular electrophilicity index.

**Key words:** chemical reactivity, electrophilic susceptibility index, nucleophilic susceptibility index, conceptual DFT.

---

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Básicas, Físicoquímica de Mezclas Líquidas, Universidad de Córdoba, Cra. 6 N° 74-103, Montería, Colombia, saifer87@gmail.com

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Básicas, Materiales y Física Aplicada, Universidad de Córdoba, Cra. 6 N° 74-103, Montería, Colombia

## INTRODUCCIÓN

La Teoría del Funcional de la Densidad (DFT, por sus siglas en inglés)<sup>1,2</sup> es un formalismo mecano-cuántico en el que la variable principal es la densidad de probabilidad electrónica,  $\rho(x, y, z)$  a partir de la cual es posible, en principio, determinar todas las propiedades de sistemas electrónicos, tales como átomos, iones y moléculas.<sup>2</sup> Desde finales de los años 90, esta teoría ha mostrado un crecimiento notable en el campo de los cálculos de estructura electrónica de moléculas y en física del estado sólido, lo que ha sido impulsado por la precisión de los cálculos cuantitativos y por su bajo costo computacional.<sup>3</sup> En particular, un enfoque paralelo de la DFT conllevó al desarrollo de descriptores que proporcionan ideas cualitativas y que permiten la cuantificación de conceptos químicos que solo habían sido tratados de forma intuitiva.<sup>3</sup> Este campo de investigación, conocido comúnmente como DFT conceptual,<sup>1,3</sup> surgió como resultado de diversas investigaciones en la University of North Carolina en Chapel Hill, bajo el liderazgo de Robert G. Parr desde los años 80. Concretamente, la DFT conceptual ha provisto diversas representaciones, donde las respuestas de los sistemas electrónicos frente a los cambios en el número de electrones  $N$ , el potencial externo  $v(r)$  y/o la densidad electrónica  $\rho(r)$ , se han identificado como funciones a partir de las cuales es posible caracterizar diversas propiedades relacionadas con la reactividad química.<sup>3</sup> Por ejemplo, la representación canónica expresa las propiedades del sistema en términos de  $N$  y  $v(r)$ ,<sup>1</sup> de este modo, cuando un agente externo interactúa con el sistema, el cambio en la energía asociado a las perturbaciones de  $N$  y  $v(r)$  puede ser escrito mediante la siguiente expansión de Taylor de segundo orden:<sup>3</sup>

$$\begin{aligned} \Delta E \equiv E[N + \Delta N, v(r) + \Delta v(r)] - E[N, v(r)] = & \\ & \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(r)} \Delta N + \int \left( \frac{\delta E}{\delta v(r)} \right)_N \delta v(r) d(r) + \\ & \frac{1}{2!} \left\{ \left( \frac{\partial^2 E}{\partial^2 N} \right)_{v(r)} (\Delta N)^2 + 2 \int \left( \frac{\partial}{\partial N} \left( \frac{\delta E}{\delta v(r)} \right) \right)_{v(r)} \Delta N \delta v(r) d(r) + \iint \left( \frac{\delta^2 E}{\delta v^2(r)} \right)_N \delta v(r) \delta v(r') dr dr' \right\} \end{aligned} \quad (1)$$

Dentro de este esquema se ha considerado que uno de los principales objetivos de la DFT conceptual ha sido darle significado físico a las derivadas de la energía que aparecen en la ecuación 1.<sup>3</sup> Concretamente, la primera derivada de la energía, con respecto al número de electrones, es el potencial químico electrónico  $\mu$ ,<sup>1,3</sup> una propiedad que ha sido identificada como la tendencia de los electrones a escapar desde un sistema en equilibrio:<sup>4</sup>

$$\mu = \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(r)} \quad (2)$$

La dureza  $\eta$ , que aparece en la ecuación 1 como la segunda derivada de la energía con respecto al número de electrones, ha sido reconocida como una propiedad que mide la resistencia de los electrones a ser transferidos desde un sistema molecular en equilibrio:<sup>3,4</sup>

$$\eta = \left( \frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right)_{v(r)} \quad (3)$$

En 1999, Parr, Szentpaly y Liu,<sup>5</sup> demostraron que cuando un sistema es saturado con electrones provenientes de los alrededores manteniendo el potencial externo constante, ocurre una disminución en la energía que es equivalente a  $-\mu^2 / 2\eta$ . El valor absoluto de esta cantidad fue definido como el índice de electrofilicidad:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (4)$$

Por lo tanto, valores altos de  $\omega$  serán característicos para los sistemas moleculares más propensos a interactuar covalentemente con especies nucleofílicas. No obstante, aunque el índice de electrofilicidad ha sido utilizado eficazmente para el estudio de la reactividad de diversos sistemas moleculares,<sup>4,6</sup> su descripción de la reactividad relativa ha resultado ser inconclusa en algunos casos.<sup>7</sup> Similarmente, los índices de filicidad propuestos por Chattaraj,<sup>8</sup> y que se derivan del concepto de electrofilicidad, no dan información adicional a la proporcionada por la suavidad local<sup>3</sup> y las funciones de Fukui<sup>3,9</sup> cuando se estudian aspectos relacionados con la reactividad intramolecular, además, para tendencias de reactividad intermolecular, los índices de filicidad pueden ser utilizados solo en limitados casos.<sup>9</sup> Con la intención de obtener descriptores de reactividad más consistentes con las observaciones experimentales, diversos trabajos han sido realizados en el ámbito de la DFT conceptual,<sup>9,10</sup> incluyendo la publicación concerniente a los índices definidos como poder electroaceptador y poder electrodonador,<sup>9,10</sup> además del trabajo recientemente publicado por Morell y colaboradores<sup>10</sup> donde se introdujeron nuevos índices locales de electrofilicidad y nucleofilicidad. Con el ánimo de contribuir a esta serie de avances en el campo de la DFT conceptual, en el presente trabajo se propone el desarrollo de dos nuevos índices globales de reactividad, denominados índice de susceptibilidad electrofílica e índice de susceptibilidad nucleofílica, respectivamente. Para validar el uso de estos índices de reactividad para sistemas moleculares, se compararon los resultados teóricos de reactividad de series de indoles y derivados quinona halo-sustituídos con los respectivos parámetros experimentales de reactividad. Los resultados obtenidos muestran que los índices de reactividad propuestos describen apropiadamente la reactividad química de los sistemas moleculares considerados.

## PARTE EXPERIMENTAL

Con el propósito de validar la utilización de los índices de susceptibilidad nucleofílica ( $\Delta\theta^-$ ) y electrofílica ( $\Delta\theta^+$ ), estos fueron calculados respectivamente para series de indoles (figura 1) y halo-quinonas (figura 2), cuyos parámetros de reactividad son experimentalmente

conocidos. Además, los valores de  $\Delta\theta$  fueron comparados con los del recíproco del poder electro-donador ( $1/\omega$ );<sup>9</sup> mientras que la predictividad de  $\Delta\theta$  fue comparada con la del índice de electrofiliidad ( $\omega$ )<sup>5</sup> y del poder electro-aceptador ( $\omega^+$ ).<sup>9</sup> Computacionalmente, todas las geometrías moleculares fueron diseñadas y pre-optimizadas por mecánica molecular mediante el Campo de Fuerzas Universal (UFF, por sus siglas en inglés) implementado en el programa Avogadro;<sup>11</sup> posteriormente, las geometrías de equilibrio fueron optimizadas analíticamente utilizando el programa NWChem 6.3<sup>12</sup> al nivel de teoría B3LYP/6-31G(d), como fue propuesto por Domingo y colaboradores<sup>13</sup> para el tratamiento teórico de los mismos indoles estudiados aquí.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Desarrollo del índice de susceptibilidad electrofílica

Manteniendo el potencial externo constante, el cambio instantáneo de la energía asociado a la respuesta de un sistema (modelado por el ensamble canónico) a la aceptación de carga eléctrica fue definido por la siguiente expansión de Taylor de segundo orden:

$$\Delta E^+ = -\Delta\mu^+ \Delta N^+ + \frac{1}{2} \eta^+ (\Delta N^+)^2 \quad (5)$$

Donde el potencial químico inicial es  $\mu^+_{0^+}$ , aumentando su valor hasta cero cuando el sistema es saturado con electrones. Expresando el potencial químico mediante una expansión de Taylor alrededor del número de electrones del sistema de referencia se tiene:<sup>3</sup>

$$\mu^+ = \mu^+_{0^+} + \left( \frac{\partial \mu^+}{\partial N^+} \right)_{v(r)} \Delta N^+ \quad (6)$$

$$\mu^+ = \mu^+_{0^+} + \eta^+ \Delta N^+ \quad (7)$$

Por lo que  $\Delta\mu^+$  se puede aproximar como:

$$\Delta\mu^+ = \eta^+ \Delta N^+ \quad (8)$$

Introduciendo este resultado en la ecuación 5, se obtiene la siguiente expresión para el cambio en la energía del sistema:

$$\Delta E^+ = -\frac{1}{2} \eta^+ (\Delta N^+)^2 \quad (9)$$

Considerando ahora que el cambio en el número de electrones permanece proporcional a  $-\mu^+_{0^+}/\eta^+$ , es posible  $\Delta N^+$  definir a por la expresión:

$$\Delta N^+ = -\frac{\mu^+_{0^+}}{\eta^+} \cdot g^+ \quad (10)$$

Aquí,  $g^+$  es una función que describe la evolución del número de electrones durante el proceso de aceptación de carga, y cuyo valor inicial es 0 tendiendo a 1 cuando el sistema es saturado con electrones, es decir, cuando  $\mu^+$  se aproxima a 0. La derivada de  $g^+$  con respecto al número de electrones se obtiene derivando implícitamente la ecuación 10:

$$\left(\frac{\partial g^+}{\partial N}\right)_{v(r)} = \frac{g^+ \cdot \gamma^+}{\eta^+} - \frac{\eta^+}{\mu_0^+} \quad (11)$$

Donde  $\gamma$  es la derivada de la dureza con respecto a  $N$  (hiperdureza):<sup>14</sup>

$$\gamma = \left(\frac{\partial \eta}{\partial N}\right)_{v(r)} \quad (12)$$

A partir de la ecuación 10, la ecuación 9 se re-escribe como:

$$\Delta E^+ = -\frac{1}{2} \frac{(\mu_0^+)^2}{\eta^+} \cdot (g^+)^2 \quad (13)$$

De esta manera, se define la función de susceptibilidad electrofílica  $\Theta^+$  como:

$$\theta^+ = \frac{1}{2} \frac{(\mu_0^+)^2}{\eta^+} \cdot (g^+)^2 \quad (14)$$

La máxima estabilización del sistema ocurre cuando  $g^+=1$ , en cuyo caso  $\Theta^+$  se convierte en el concepto de poder electro-aceptador ( $\omega^+$ ):<sup>9,10</sup>

$$\omega^+ = \lim_{g^+ \rightarrow 1} \theta^+ = \frac{1}{2} \frac{(\mu_0^+)^2}{\eta^+} \quad (15)$$

Por otro lado, la derivada de la función de susceptibilidad electrofílica con respecto a  $N$  está dada por:

$$\begin{aligned} \left(\frac{\partial \theta^+}{\partial N}\right)_{v(r)} &= \frac{(\mu_0^+)^2}{2} \left[ -\frac{\gamma^+ (g^+)^2}{(\eta^+)^2} + \frac{2g^+}{\eta^+} \left(\frac{\partial g^+}{\partial N}\right)_{v(r)} \right] \\ \left(\frac{\partial \theta^+}{\partial N}\right)_{v(r)} &= \frac{(\mu_0^+)^2}{2} \left[ \frac{\gamma^+ (g^+)^2}{(\eta^+)^2} - \frac{2g^+}{\mu_0^+} \right] \end{aligned} \quad (16)$$

En la situación límite en la que el sistema de referencia es saturado con la máxima cantidad de electrones, el valor de  $g^+$  tiende a 1, mientras que  $\Delta N^+$  alcanza su máximo valor:  $\Delta N^+_{max} = -\mu^+_0 / \eta^+$ . En estas condiciones, se define el índice de susceptibilidad electrofílica como:

$$\Delta \theta^+ = \lim_{g^+ \rightarrow 1} \left(\frac{\partial \theta^+}{\partial N}\right)_{v(r)} = \frac{1}{2} \frac{(\mu_0^+)^2}{(\eta^+)^2} \gamma^+ - \mu_0^+ \quad (17)$$

Ya que el potencial químico es siempre negativo, se espera que valores altos positivos de  $\Delta\theta^+$  sean característicos de sistemas moleculares altamente electrofílicos.

### Desarrollo del índice de susceptibilidad nucleofílica

Manteniendo el potencial externo constante, el cambio instantáneo del gran potencial asociado a la respuesta de un sistema (modelado por el ensamble gran canónico) a la donación de carga eléctrica está dado por la siguiente expansión de Taylor de segundo orden:<sup>10</sup>

$$\Delta\Omega^- = -\Delta\mu^- \Delta N^- - \frac{1}{2} S^- (\Delta\mu^-)^2 \quad (18)$$

Donde el potencial químico inicial es  $\mu_0^-$ , aumentando su valor hasta cero cuando el sistema dona la máxima cantidad de electrones. Ya que  $\Delta N^-$  es negativo,  $\Delta\mu^-$  debe expresarse como:

$$\Delta\mu^- = -\eta^- \Delta N^- \quad (19)$$

Introduciendo este resultado en la ecuación 18, se obtiene la siguiente expresión para el cambio en el gran potencial del sistema:

$$\Delta\Omega^- = \frac{1}{2} \eta^- (\Delta N^-)^2 \quad (20)$$

Asumiendo que el cambio en el número de electrones permanece proporcional a  $\mu_0^-/\eta^-$ ,<sup>10</sup> es posible definir a  $\Delta N^-$  por la expresión:

$$\Delta N^- = \frac{\mu_0^-}{\eta^-} \cdot g^- \quad (21)$$

Nuevamente, se ha introducido una función  $g^-$  que describe la evolución del número de electrones durante el proceso de donación de carga, y cuyo valor inicial es 0 tendiendo a 1 cuando el sistema dona la máxima cantidad de electrones, es decir, cuando  $\mu^-$  se aproxima a 0. La derivada de  $g^-$  con respecto al número de electrones se obtiene derivando implícitamente la ecuación 21:

$$\left( \frac{\partial g^-}{\partial N} \right)_{v(r)} = \frac{\eta^-}{\mu_0^-} - \frac{g^- \cdot \gamma^-}{\eta^-} \quad (22)$$

Utilizando el resultado de la ecuación 21, es posible re-escribir la ecuación 20 como:

$$\Delta\Omega^- = \frac{1}{2} \frac{(\mu_0^-)^2}{\eta^-} \cdot (g^-)^2 \quad (23)$$

Ahora, se define la función de susceptibilidad nucleofílica  $\theta^-$  como el recíproco de  $\Delta\Omega^-$ :

$$\theta^- = \frac{2\eta^-}{(\mu_0^-)^2} \cdot \frac{1}{(g^-)^2} \quad (24)$$

La máxima desestabilización del sistema ocurre cuando  $g^- = 1$ , en cuyo caso  $\Theta$  se convierte en el recíproco del concepto de poder electro-donador ( $\omega$ ):<sup>9,10</sup>

$$\frac{1}{\omega^-} = \lim_{g^- \rightarrow 1} \theta^- = \frac{2\eta^-}{(\mu_0^-)^2} \quad (25)$$

Por otro lado, la derivada de la función de susceptibilidad nucleofílica con respecto a  $N$  está dada por:

$$\begin{aligned} \left(\frac{\partial \theta^-}{\partial N}\right)_{v(r)} &= \frac{2}{(\mu_0^-)^2} \left[ \frac{\gamma^-}{(g^-)^2} - \frac{2\eta^-}{(g^-)^3} \left(\frac{\partial g^-}{\partial N}\right)_{v(r)} \right] \\ \left(\frac{\partial \theta^+}{\partial N}\right)_{v(r)} &= \frac{2}{(\mu_0^-)^2} \left[ \frac{3\gamma^-}{(g^-)^2} - \frac{2(\eta^-)^2}{\mu_0^- (g^-)^3} \right] \end{aligned} \quad (26)$$

En la situación límite en la que el sistema de referencia dona la máxima cantidad de electrones, el valor de  $g^-$  tiende a 1, mientras que  $\Delta N^{\max} = \mu_0^- / \eta^-$ . De esta forma, se define el índice de susceptibilidad nucleofílica como:

$$\Delta \theta^- = \lim_{g^- \rightarrow 1} \left(\frac{\partial \theta^-}{\partial N}\right)_{v(r)} = 6 \frac{\gamma^-}{(\mu_0^-)^2} - 4 \frac{(\eta^-)^2}{(\mu_0^-)^3} \quad (27)$$

Finalmente, debido a que el potencial químico es siempre negativo, valores altos positivos de  $\Delta \Theta$  deberán ser característicos de sistemas moleculares altamente nucleofílicos.

La selección de las moléculas empleadas para la validación de los índices  $\Delta \Theta^+$  y  $\Delta \Theta^-$  en el presente trabajo se realizó con base en la disponibilidad de información experimental sobre la reactividad química de las mismas; en particular, la reactividad nucleofílica de la serie de indoles 5-sustituidos fue medida frente al 4,6-dinitrobenzofuroxano (DNBF) y reportada por Lakhdar y colaboradores<sup>15</sup> en términos del parámetro de nucleofilicidad de Mayr ( $N$ ); mientras que los datos experimentales de reactividad electrofílica de las halo-quinonas fueron obtenidos por su reacción con siloaxialquenos, enaminas y aminas, y reportados por Guo y Mayr<sup>16</sup> mediante el parámetro de electrofiliidad  $E$ . Los índices de susceptibilidad nucleofílica y el poder electro-donador utilizados para reproducir la reactividad nucleofílica de los indoles, fueron calculados respectivamente por:

$$\Delta \theta^- = 6 \frac{\gamma}{(\mu^-)^2} - 4 \frac{\eta^2}{(\mu^-)^3} \quad (28)$$

$$\omega^- = \frac{1}{2} \frac{(\mu^-)^2}{\eta} \quad (29)$$



donde se han removido los sub-índices 0, y además se ha utilizado el esquema de interpolación de Gázquez, Cedillo y Vela<sup>9</sup> para el cálculo de los potenciales químicos y la dureza:

$$\eta^+ = \eta^- = \eta = \frac{1}{2}(I - A) \quad (30)$$

$$\mu^- = -\frac{1}{4}(3I + A) \quad (31)$$

$$\mu^+ = -\frac{1}{4}(I + 3A) \quad (32)$$

Los valores de la energía de ionización ( $I$ ) y afinidades electrónicas ( $A$ ) fueron calculados de acuerdo al esquema propuesto por Vargas y colaboradores.<sup>17</sup> Por otra parte, los valores de la hiper-dureza fueron aproximados mediante el teorema de Koopmans:<sup>18</sup>

$$\gamma = \varepsilon_{LUMO} - 2\varepsilon_{HOMO} + \varepsilon_{HOMO-1} \quad (33)$$

Por otro lado, los valores de los índices de susceptibilidad electrofílica, poder electro-donador, e índice de electrofílicidad fueron calculados respectivamente como:

$$\Delta\theta^+ = \frac{1}{2} \frac{(\mu^+)^2 \gamma}{\eta^2} - \mu^+ \quad (34)$$

$$\omega^+ = \frac{1}{2} \frac{(\mu^+)^2}{\eta} \quad (35)$$

$$\omega = \frac{1}{2} \frac{\mu^2}{\eta} \quad (36)$$

donde el potencial químico  $\mu$  está dado como el promedio de los valores de  $\mu^+$  y  $\mu^-$ .<sup>9</sup>

Los valores de los descriptores de reactividad de las moléculas estudiadas fueron registrados en la tabla 1 junto con los respectivos valores experimentales de los parámetros de reactividad.

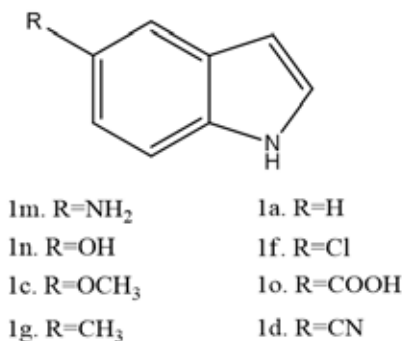
**Tabla 1.** Valores de los descriptores de reactividad de las moléculas estudiadas.

<b>indoles</b>	$\Delta\theta^-$	$1/\omega^-$	$N$	
1m	4,738	0,8764	7,22	
1n	3,928	0,7425	6,44	
1c	4,059	0,7647	6,22	
1g	3,882	0,7299	6,00	
1a	3,810	0,7202	5,55	
1f	3,261	0,6394	4,42	
1o	2,847	0,5939	3,97	
1d	2,606	0,5477	2,83	
<b>halo-quinonas</b>	$\Delta\theta^+$	$\omega^+$	$\omega$	$E$
1 <sup>a</sup>	3,350	0,5068	1,607	-16,19
1b	3,839	0,6843	1,862	-16,11
1c	3,983	0,8089	2,001	-13,84
1d	4,021	0,7396	1,981	-11,12
1e	3,656	2,833	4,306	-12,02

Valores de  $\Delta\theta^-$  y  $1/\omega^-$  en  $eV^{-1}$ ,  $\Delta\theta^+$ ,  $\omega^+$  y  $\omega$  en  $eV$

### Reactividad nucleofílica de indoles 5-sustituidos

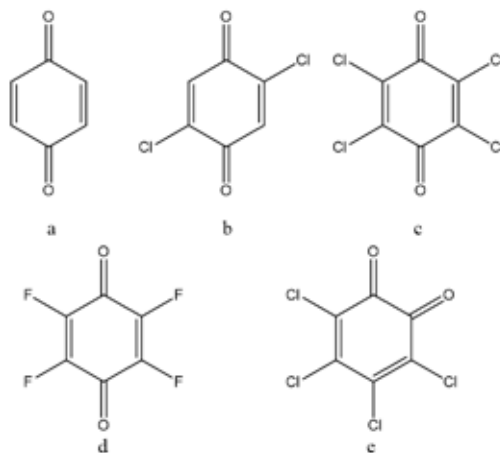
Con respecto a la reactividad de los indoles 1m a 1d, se observa que los valores de  $\Delta\theta^-$  y  $1/\omega^-$  dieron el mismo orden relativo de reactividad, siendo 1m y 1d los derivados con menor y mayor carácter nucleofílico, respectivamente. De este modo, la escala de reactividad dada por ambos descriptores difiere de la escala experimental de reactividad solo en el orden relativo de los compuestos 1n y 1c, ya que las medidas experimentales del parámetro  $N$  sugieren que 1c es más nucleofílico. Por lo tanto, ya que la descripción cualitativa de reactividad dada por el índice de susceptibilidad es equivalente a la del recíproco del poder electro-donador, se infiere que  $\Delta\theta^-$  es un descriptor de reactividad con potencialidad para el tratamiento teórico de la reactividad nucleofílica de sistemas moleculares. Adicionalmente, los valores de  $\Delta\theta^-$  y  $1/\omega^-$  fueron correlacionados con los de  $N$  mediante análisis de regresión lineal, donde se tomaron los valores experimentales como variable dependiente. En este contexto, los coeficientes de determinación lineal  $R^2$  exhibieron valores de 0,9546 y 0,9462 para  $N$  como función de  $\Delta\theta^-$  y  $1/\omega^-$ , respectivamente, por lo que se infiere que, desde el punto de vista estadístico los valores de  $\Delta\theta^-$  representan más apropiadamente las variaciones experimentales observadas en el parámetro de reactividad  $N$ . Así, se concluye que en comparación con  $1/\omega^-$ ,  $\Delta\theta^-$  es un mejor descriptor de nucleofilidad para el estudio teórico de la reactividad de la serie de indoles considerados aquí.



**Figura 1.** Estructuras de los indoles 5-sustituídos estudiados en el presente trabajo.

### Reactividad electrofílica de quinonas halogenadas

Para la serie de quinonas halogenadas 1a a 1e, tres descriptores electrofílicos fueron utilizados para reproducir los datos experimentales de reactividad, incluyendo el índice de susceptibilidad desarrollado en el presente trabajo, así como los índices de electrofílicidad y el poder electro-donador. Los valores del parámetro de electrofílicidad  $E$  de estos compuestos dan el orden de reactividad 1a-1b-1c-1e-1d, siendo 1d el más electrofílico. Desde el punto de vista teórico, los valores de  $\omega^+$  y  $\omega$  dieron lugar a una misma escala de reactividad que difiere de la escala experimental en el orden de reactividad de los derivados 1c y 1d, además del hecho de que estos descriptores resultaron sobre-estimar la reactividad de la quinona 1e. Concretamente, aunque se esperaría que 1d mostrara un valor más alto que 1c en cuanto a los descriptores electrofílicos, los valores de  $\omega^+$  y  $\omega$  obtenidos para 1c fueron mayores que los de 1d; además los valores de  $\omega^+$  y  $\omega$  para la quinona 1e resultaron ser varias veces mayor en magnitud en comparación con los del derivado más electrofílico (1d), lo que obviamente va en contra de lo experimentalmente observado.



**Figura 2.** Estructuras de las halo-quinonas estudiadas.

Por otro lado, los valores del índice de susceptibilidad electrofílica  $\Delta\theta^+$  mostraron una correcta descripción de la reactividad relativa de los compuestos 1a a 1d, no obstante,  $\Delta\theta^+$  sub-estimó la reactividad del derivado quinona 1e por debajo de la reactividad de 1b. Aun así, en comparación con  $\omega^+$  y  $\omega$ , la reactividad electrofílica dada por  $\Delta\theta^+$  fue más consistente con lo experimentalmente observado para la serie de quinonas halogenadas.

## CONCLUSIONES

Utilizando las representaciones canónica y gran canónica de la DFT conceptual, se modelaron los cambios en la energía y gran potencial, respectivamente, a través de un formalismo paralelo al propuesto en otros trabajos.<sup>5,9,10</sup> De esta forma, se definieron las funciones de susceptibilidad electrofílica y nucleofílica, que equivalen a los conceptos de poder electro-aceptador y poder electro-donador cuando el sistema de referencia se encuentra en la situación límite en la que es saturado con electrones y cuando dona la máxima cantidad de carga, respectivamente. El índice de susceptibilidad electrofílica ( $\Delta\theta^+$ ) fue introducido formalmente como la razón de cambio de la función de susceptibilidad electrofílica en el límite en el que el sistema es saturado con electrones; por otro lado, se definió el índice de susceptibilidad nucleofílica ( $\Delta\theta^-$ ) como la razón de cambio de la función de susceptibilidad nucleofílica en el límite en el que el sistema dona la máxima cantidad de carga. Empleando el esquema de interpolación bi-parabólico propuesto por Gázquez y colaboradores,<sup>9</sup> se establecieron las ecuaciones 28 y 34 como las ecuaciones de trabajo para el cálculo de  $\Delta\theta^-$  y  $\Delta\theta^+$ , respectivamente. Con el objetivo de validar el uso de estos nuevos índices de reactividad, estos fueron utilizados para reproducir las tendencias de reactividad de series de indoles 5-sustituídos y quinonas halogenadas. Desde el punto de vista metodológico, la estructura electrónica de los sistemas moleculares mencionados fue tratada utilizando el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d), que mostró ser apropiado para los propósitos del trabajo realizado. En general, los resultados obtenidos mostraron que los índices  $\Delta\theta^-$  y  $\Delta\theta^+$  resultaron ser más apropiados que otros descriptores de reactividad tales como el poder electro-donador y los índices de electrofílicidad para el estudio teórico de la reactividad de los indoles y quinonas, respectivamente, por lo tanto, estos nuevos índices podrían ser sometidos a estudios adicionales con el propósito de corroborar su potencialidad para el tratamiento teórico de la reactividad química de sistemas moleculares más complejos.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Universidad de Córdoba por el apoyo prestado para la realización del presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parr RG, Yang W. "Density-functional theory of atoms and molecules". 16va ed. New York: Oxford university press; 1989.
2. Cramer CJ. "Essentials of computational chemistry: theories and models". 2da ed. Chichester: John Wiley & Sons; 2013.
3. Proft FD, Ayers PW, Geerlings P. The Conceptual Density Functional Theory Perspective of Bonding. En Frenking G, Shaik S. Edit. Chemical Bond: Fundamental aspects of chemical bonding. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2014. p 233-270.
4. Martínez-Araya JI, Salgado-Morán G, Glossman-Mitnik D. Computational Nutraceuticals: Chemical Reactivity Properties of the Flavonoid Naringin by Means of Conceptual DFT. *J Chem.* 2013; 2013: 850297.
5. Parr RG, Szentpaly L v, Liu S. Electrophilicity index. *J Am Chem Soc.* 1999; 121(9): 1922-4.
6. Singh O, R Kakularam K, Reddanna P, Aparoy P. Understanding the dual inhibition of COX-2 and Carbonic anhydrase-II by Celecoxib and CG100649 using Density functional theory calculations and other Molecular Modelling approaches. *Protein Pept Lett.* 2015; 22(10): 903-12.
7. Mendoza Huizar LH, Rios-Reyes CH, Olvera-Maturano NJ, Robles J, Rodriguez JA. Chemical reactivity of quinclorac employing the HSAB local principle-Fukui function. *Open Chem.* 2015; 13(1): 52-60.
8. Chattaraj PK, Maiti B, Sarkar U. Philicity: a unified treatment of chemical reactivity and selectivity. *J Phys Chem A.* 2003; 107(25): 4973-5.
9. Orozco-Valencia ÁU, Vela A. The Electrodonating and Electroaccepting Powers in Atoms. *J Mex Chem Soc.* 2012; 56(3):294-301.
10. Morell C, Gázquez JL, Vela A, Guégan F, Chermette H. Revisiting electroaccepting and electrodonating powers: proposals for local electrophilicity and local nucleophilicity descriptors. *Phys Chem Chem Phys.* 2014; 16(48): 26832-42.
11. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminformatics.* 2012; 4(1):17.
12. Valiev M, Bylaska EJ, Govind N, Kowalski K, Straatsma TP, Van Dam HJ, et al. NWChem: a comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations. *Comput Phys Commun.* 2010; 181(9): 1477-89.
13. Domingo LR, Pérez P. The nucleophilicity N index in organic chemistry. *Org Biomol Chem.* 2011; 9(20): 7168-75.
14. Fuentealba P, Parr RG. Higher-order derivatives in density-functional theory, especially the hardness derivative  $\partial \eta / \partial N$ . *J Chem Phys.* 1991; 94(8): 5559-64.
15. Lakhdar S, Westermaier M, Terrier F, Goumont R, Boubaker T, Ofial AR, et al. Nucleophilic reactivities of indoles. *J Org Chem.* 2006; 71(24): 9088-95.
16. Guo X, Mayr H. Quantification of the Ambident Electrophilicities of Halogen-Substituted Quinones. *J Am Chem Soc.* 2014; 136(32): 11499-512.
17. Vargas R, Garza J, Cedillo A. Koopmans-like approximation in the Kohn-Sham method

- and the impact of the frozen core approximation on the computation of the reactivity parameters of the density functional theory. *J Phys Chem A*. 2005; 109(39): 8880-92.
18. Cárdenas C, Rabi N, Ayers PW, Morell C, Jaramillo P, Fuentealba P. Chemical reactivity descriptors for ambiphilic reagents: dual descriptor, local hypersoftness, and electrostatic potential. *J Phys Chem A*. 2009; 113(30): 8660-7.
  19. Cárdenas C, Rabi N, Ayers PW, Morell C, Jaramillo P, Fuentealba P. Chemical reactivity descriptors for ambiphilic reagents: dual descriptor, local hypersoftness, and electrostatic potential. *J. Phys. Chem. A* 2009; 113(30): 8660-7.

## INTERACCIONES DEL ÁCIDO DL-2-AMINO BUTÍRICO EN SOLUCIONES ACUOSAS DE NITRATO DE SODIO A VARIAS TEMPERATURAS

Manuel S. Páez M.<sup>a</sup>, Dairo E. Pérez S.<sup>a</sup>, Oscar Julio M.<sup>a</sup>

### RESUMEN

Se midieron las densidades del ácido DL-2-aminobutírico en soluciones acuosas de nitrato de sodio en el intervalo de temperaturas de 283,15 a 313,15 K cada 5 K, utilizando un densímetro de tubo vibratorio Anton Paar DMA 5000. Se calcularon los volúmenes molares aparentes y aparentes límites, la segunda derivada del volumen molar parcial límite con temperatura, el volumen molar parcial de transferencia límite y los números de hidratación. Se encontró que los valores de la segunda derivada del volumen molar aparente límite con temperatura son negativos a todas las concentraciones del solvente mixto; lo que indica que se favorecen las interacciones soluto-solvente y que el DL-ácido aminobutírico actúa como un disruptor de la estructura del solvente.

**Palabras clave:** densidad, volumen molar aparente, volumen molar parcial de transferencia, DL-ácido aminobutírico, soluciones acuosas.

## INTERACTIONS OF DL-2-AMINO BUTIRIC ACID IN AQUEOUS SOLUTIONS OF SODIUM NITRATE AT DIFFERENT TEMPERATURES.

### ABSTRACT

Densities of DL-2-aminobutiric acid in aqueous solutions of nitrate sodium were determined every 5 K at temperatures ranging from 283,15 to 318,15 K using an Anton Paar DMA 5000 vibrating tube densitometer. The apparent molar volume, the infinite dilution apparent molar volume, the second derivative of the infinite dilution partial molar volume with respect to temperature, the partial molar volume of transfer at infinite dilution, and the number of hydration were calculated. It was found that the values of the second derivative of the apparent molar volume limit with respect to temperature are negative at all concentrations of mixed solvent; This implies that the solute-solvent interactions are favored and that the DL-2-aminobutiric acid acts as a disruptor of the structure of the solvent.

**Key words:** density, apparent molar volume, partial molar volume of transfer, DL-2-aminobutiric acid, aqueous solution.

---

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Química, Universidad de Córdoba, Km 3. Vía a Cereté, Carrera 6 N° 76 - 103. Montería-Córdoba, Colombia, mspaezm@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

Los aminoácidos como unidades estructurales fundamentales de péptidos y proteínas juegan un importante papel en los sistemas biológicos, porque afectan la solubilidad, la desnaturalización y la actividad de las biomoléculas. El estudio de las propiedades termofísicas de estos compuestos modelo (aminoácidos) en soluciones acuosas electrolíticas proporciona información importante acerca de las interacciones soluto-solvente y soluto-soluto en biomoléculas.<sup>1</sup> Por tal motivo, en los últimos años se ha incrementado considerablemente el estudio del efecto que tienen los co-solutos y las sustancias iónicas, en general, sobre el predominio de las interacciones moleculares que pueden estar presentes en las soluciones acuosas de aminoácidos.<sup>2</sup>

Unas de las herramientas más utilizadas a través de los años para el estudio de las interacciones moleculares se ha enfocado en el análisis de las propiedades termofísicas de las soluciones, dentro de las cuales se han destacado de manera muy significativa las propiedades volumétricas de las mezclas,<sup>3</sup> como los volúmenes molares aparentes y volúmenes molares de transferencia límites.<sup>4</sup> Estos estudios han demostrado ser muy útiles en el entendimiento de la naturaleza de la acción de aminoácidos, péptidos y proteínas en los sistemas vivos. La opinión predominante es que la estabilidad de la estructura nativa de las proteínas y el reconocimiento molecular es dominado por las fuerzas hidrofóbicas. Sin embargo, en años recientes se ha demostrado que las interacciones hidrofílicas pueden ser tan importantes como las hidrofóbicas.<sup>5</sup>

En este trabajo se estudian las propiedades volumétricas, debido a que estas son útiles para determinar el efecto que causa la adición de una sal sobre el comportamiento de los aminoácidos; siendo esta información de gran importancia para el estudio de la hidratación de péptidos y proteínas en medios salinos.<sup>6</sup> Por tal motivo, en este trabajo se reportan las densidades ( $\rho$ ) del ácido DL-2-aminobutírico en función de la molalidad del nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) a las temperaturas de 283.15, 288.15, 293.15, 298.15, 303.15, 308.15, 313.15 y 318.15 K. Los valores experimentales de densidad ( $\rho$ ) se usaron para calcular volúmenes molares aparentes ( $v_\phi^0$ ), volúmenes molares aparentes límites ( $v_\phi^0$ ), pendiente límite experimental ( $s_\phi$ ), segunda derivada del volumen molar aparente límite con temperatura ( $\partial^2 v_\phi^0 / \partial T^2$ ), volúmenes molares de transferencia ( $\Delta_{tr} v_\phi^0$ ) y números de hidratación ( $N_H$ ). El comportamiento de estos parámetros con la concentración y la temperatura fue analizado en términos de las interacciones que ocurren a nivel de la solución.

## PARTE EXPERIMENTAL

Los reactivos usados fueron, ácido DL-2-aminobutírico grado analítico (99%) adquirida de la casa comercial Alfa Aesar. Antes de su uso el ácido DL-2-aminobutírico fue recrystalizado en agua y secado al vacío sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$ .<sup>7</sup> El agua usada para preparar las soluciones fue bidestilada y desgasificada y presentó una conductividad menor que  $2.0 \mu\text{Scm}^{-1}$ . En este trabajo, se prepararon seis solventes pseudobinarios (mezclas acuosas de  $\text{NaNO}_3$ ), para mezclarlos con cantidades apropiadas de ácido DL-2-aminobutírico. Las soluciones fueron preparadas en



la escala de molalidad utilizando el método gravimétrico, en recipientes de vidrio con tapa, tomando todas las precauciones necesarias para evitar la contaminación de las muestras y la pérdida de masa por evaporación de los líquidos utilizados. Todas las medidas de masa fueron realizadas en una balanza analítica Precisa Executive Pro 360 EP 225SM-DR, con una incertidumbre de  $\pm 1 \times 10^{-5}$  g. Luego se determinaron las densidades de los componentes puros y sus mezclas con un densímetro de tubo vibratorio Anton Paar DMA 5000, con una incertidumbre de  $1 \times 10^{-5}$  g/cm<sup>3</sup> y un control de temperatura de  $\pm 0.001$  K en el intervalo de temperatura 283.15-318.15 K.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores experimentales de la densidad, ( $\rho$ ), para todas las mezclas pseudobinarias derivadas del NaNO<sub>3</sub> en función de la molalidad del aminoácido ( $m_{aa}$ ) en el intervalo de temperatura de 283.15 a 318.15 K, fueron tabulados en la tabla 1. En ellos se puede observar que al aumentar la temperatura del sistema, la densidad de la mezcla disminuye. Además, también se puede apreciar que al aumentar la molalidad del aminoácido ( $m_{aa}$ ) en la mezcla pseudobinaria, la densidad de esta disminuye.

Los volúmenes molares aparentes de la mezcla pseudobinaria fueron calculados a partir de las medidas de densidad a cada temperatura mostradas en la tabla 1, mediante la siguiente ecuación (1):

$$V_{\phi} = \frac{M}{\rho} - \frac{1000(\rho - \rho_0)}{m\rho\rho_0} \quad (1)$$

Donde M es la masa molar del aminoácido, m es la molalidad del ácido DL-2-aminobutírico, que es definida como las moles del ácido DL-2-aminobutírico por kilogramo de solvente pseudobinario,  $\rho$  y  $\rho_0$  son respectivamente, la densidad de la solución (ácido DL-2-aminobutírico + solución acuosa de NaNO<sub>3</sub>) y la densidad del solvente pseudobinario (solución acuosa de NaNO<sub>3</sub>) a la molalidad de trabajo. La incertidumbre para los valores de  $v_{\phi}^0$  fue en promedio  $\pm 0.09$  cm<sup>3</sup>•mol<sup>-1</sup>. Los resultados de los volúmenes molares aparentes de las soluciones pseudobinarias son reportados en la tabla 2.

Los volúmenes molares aparentes límites  $v_{\phi}^0$  del aminoácido en la mezcla pseudobinaria se obtuvieron usando un procedimiento de regresión lineal con ayuda de la ecuación (2).<sup>2</sup>

$$V_{\phi} = V_{\phi}^0 + S_v m \quad (2)$$

Donde  $S_v$  es la pendiente experimental, también considerada como el coeficiente volumétrico virial, el cual caracteriza las interacciones pares entre las especies de soluto (ácido DL-2-aminobutírico) solvatados en la solución, mientras que  $v_{\phi}^0$  refleja la presencia de interacciones soluto-solvente (ácido DL-2-aminobutírico + solución acuosa de NaNO<sub>3</sub>).<sup>1</sup> Los valores de  $v_{\phi}^0$  y  $S_v$  se muestran en la tabla 3 con una desviación estándar promedio de  $\pm 0.05$  (cm<sup>3</sup>•mol<sup>-1</sup>) y  $\pm 0.09$  (m<sup>3</sup>•mol<sup>-2</sup>•kg), respectivamente.

**Tabla 1.** Densidad de las soluciones del ácido DL-2-aminobutírico en seis (6) solventes pseudobinarios: I-VI, de la concentración en NaNO<sub>3</sub> especificada en la tabla.

T K	283.15	288.15	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15	318.15
$\rho$ (g·cm <sup>-3</sup> )								
$m_{aa}$	$m_{NaNO_3}$ (mol·kg <sup>-1</sup> ) en el solvente pseudobinario (NaNO <sub>3</sub> + Agua): 0.0105 (I)							
0.0000	1.00039	0.99973	0.99889	0.99773	0.99628	0.99466	0.99283	0.99081
0.0508	1.00157	1.00087	0.99998	0.99878	0.99729	0.99554	0.99376	0.99173
0.0812	1.00235	1.00162	1.00074	0.99953	0.99802	0.99626	0.99447	0.99243
0.0991	1.00281	1.00211	1.00122	0.99999	0.99848	0.99673	0.99493	0.99288
0.2011	1.00556	1.00484	1.00394	1.00272	1.00123	0.99945	0.99769	0.99560
0.4005	1.00978	1.00902	1.00806	1.00679	1.00525	1.00343	1.00161	0.99947
0.6006	1.01314	1.01229	1.01135	1.01003	1.00844	1.00664	1.00476	1.00256
0.8017	1.01577	1.01484	1.01382	1.01245	1.01087	1.00903	1.00706	1.00481
$m_{aa}$	0.0414 (II)							
0.0000	1.00215	1.00146	1.00060	0.99941	0.99795	0.99630	0.99446	0.99242
0.0511	1.00334	1.00263	1.00174	1.00049	0.99901	0.99736	0.99550	0.99346
0.0807	1.00410	1.00339	1.00249	1.00122	0.99974	0.99808	0.99621	0.99416
0.1005	1.00462	1.00391	1.00301	1.00174	1.00025	0.99858	0.99672	0.99466
0.2018	1.00734	1.00660	1.00568	1.00443	1.00291	1.00123	0.99935	0.99726
0.4012	1.01158	1.01081	1.00986	1.00853	1.00698	1.00526	1.00333	1.00123
0.6019	1.01499	1.01417	1.01322	1.01187	1.01029	1.00855	1.00660	1.00450
0.8015	1.01771	1.01686	1.01591	1.01441	1.01269	1.01105	1.00906	1.00683
$m_{aa}$	0.1 001 (III)							
0.0000	1.00549	1.00475	1.00383	1.00259	1.00110	0.99942	0.99754	0.99548
0.0503	1.00667	1.00590	1.00498	1.00368	1.00216	1.00048	0.99857	0.99650
0.0802	1.00743	1.00666	1.00573	1.00442	1.00290	1.00120	0.99930	0.99722
0.0997	1.00795	1.00718	1.00625	1.00494	1.00339	1.00170	0.99979	0.99771
0.2003	1.01063	1.00985	1.00886	1.00757	1.00603	1.00432	1.00240	1.00030
0.4012	1.01489	1.01406	1.01308	1.01177	1.01020	1.00847	1.00648	1.00437
0.6012	1.01833	1.01750	1.01645	1.01519	1.01358	1.01183	1.00991	1.00780
0.8004	1.02109	1.02017	1.01916	1.01784	1.01624	1.01453	1.01258	1.01048
$m_{aa}$	0.4025 (IV)							
0.0000	1.02253	1.02150	1.02031	1.01884	1.01718	1.01531	1.01329	1.01110
0.0521	1.02371	1.02266	1.02144	1.01995	1.01827	1.01640	1.01437	1.01216
0.0810	1.02441	1.02337	1.02216	1.02065	1.01897	1.01708	1.01505	1.01283
0.1006	1.02493	1.02387	1.02266	1.02115	1.01946	1.01757	1.01553	1.01331
0.2045	1.02763	1.02655	1.02530	1.02377	1.02206	1.02014	1.01810	1.01586
0.4031	1.03167	1.03057	1.02927	1.02773	1.02603	1.02412	1.02200	1.01976
0.6030	1.03499	1.03387	1.03257	1.03099	1.02927	1.02737	1.02528	1.02305
0.8052	1.03762	1.03645	1.03520	1.03361	1.03190	1.02999	1.02789	1.02565
$m_{aa}$	0.9043 (V)							
0.0000	1.05028	1.04872	1.04709	1.04525	1.04333	1.04116	1.03890	1.03650
0.0503	1.05137	1.04979	1.04814	1.04627	1.04433	1.04214	1.03987	1.03746
0.0804	1.05208	1.05050	1.04884	1.04697	1.04501	1.04282	1.04055	1.03814
0.1013	1.05260	1.05101	1.04933	1.04746	1.04552	1.04332	1.04104	1.03861
0.2020	1.05511	1.05350	1.05180	1.04991	1.04795	1.04574	1.04345	1.04101
0.4011	1.05889	1.05733	1.05560	1.05362	1.05170	1.04949	1.04716	1.04467
0.6004	1.06186	1.06029	1.05858	1.05661	1.05466	1.05247	1.05011	1.04765
0.8010	1.06408	1.06251	1.06078	1.05878	1.05686	1.05475	1.05241	1.04994
$m_{aa}$	1.1966 (VI)							
0.0000	1.064230	1.062589	1.060776	1.058799	1.056674	1.054408	1.051924	1.049113
0.0498	1.065272	1.063624	1.061801	1.059799	1.057649	1.055368	1.052876	1.050063
0.0808	1.066018	1.064350	1.062502	1.060488	1.058348	1.056052	1.053546	1.050729
0.0997	1.066487	1.064815	1.062940	1.060931	1.058787	1.056480	1.053977	1.051177
0.2017	1.068986	1.067292	1.065411	1.063380	1.061226	1.058916	1.056397	1.053565
0.4009	1.072760	1.071055	1.069149	1.067070	1.064908	1.062585	1.060045	1.057185
0.6032	1.075722	1.073973	1.072053	1.069950	1.067795	1.065488	1.062960	1.060152
0.8071	1.077833	1.076124	1.074218	1.072098	1.070001	1.067736	1.065189	1.062428

**Tabla 2.** Volúmenes molares aparentes  $v_{\phi}$  del ácido DL-2-aminobutírico en seis (6) solventes pseudobinarios en función de la concentración molar del aminoácido ( $m_{ad}$ ) a las temperaturas de: 283.15, 288.15, 293.15, 298.15, 303.15, 308.15, 313.15 y 318.15 K.

Solvente pseudobinario		I	II	III	IV	V	VI			I	II	III	IV	V	VI
T (K)	$m_{ad}$ (mol·kg)	$V_{\phi}$ (cm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> )						T (K)	$V_{\phi}$ (cm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> )						
283.15	0.0508	79.83	79.62	79.32	79.16	78.49	78.30	303.15	83.40	82.32	81.82	81.00	80.55	79.93	
	0.0812	78.82	78.72	78.49	78.42	77.74	77.26		81.80	80.97	80.52	79.91	79.48	78.96	
	0.0991	78.47	78.20	77.99	77.93	77.28	76.72		81.00	80.16	79.80	79.31	78.88	78.41	
	0.2011	77.04	76.93	76.79	76.58	76.14	75.74		78.33	78.24	78.05	77.93	77.50	77.05	
	0.4005	78.92	78.75	78.65	78.44	78.08	77.47		80.22	79.98	79.61	79.44	79.03	78.57	
	0.6006	80.75	80.61	80.39	80.08	79.82	79.20		82.11	81.73	81.29	81.03	80.63	80.22	
	0.8017	82.65	82.32	82.01	81.69	81.49	80.92		83.94	83.59	82.88	82.48	82.25	81.72	
288.15	0.0508	80.66	80.01	79.86	79.47	78.83	78.53	308.15	83.94	82.49	82.18	81.27	80.93	80.33	
	0.0812	79.66	79.04	78.90	78.68	78.06	77.61		82.30	81.21	80.94	80.22	79.90	79.43	
	0.0991	78.95	78.48	78.32	78.18	77.61	77.11		81.24	80.46	80.23	79.63	79.30	78.90	
	0.2011	77.33	77.17	77.04	76.91	76.48	76.05		78.65	78.52	78.36	78.25	77.78	77.37	
	0.4005	79.20	78.98	78.91	78.66	78.18	77.71		80.55	80.26	79.87	79.65	79.24	78.82	
	0.6006	81.20	80.79	80.59	80.30	79.93	79.45		82.33	82.00	81.51	81.18	80.79	80.42	
	0.8017	83.03	82.60	82.30	81.92	81.6	81.11		84.20	83.71	83.04	82.66	82.32	81.86	
293.15	0.0508	81.60	80.60	80.00	79.72	79.24	78.81	313.15	85.15	83.06	82.58	81.57	81.24	80.64	
	0.0812	80.26	79.51	79.01	78.95	78.53	78.14		83.25	81.62	81.23	80.52	80.17	79.79	
	0.0991	79.47	78.91	78.49	78.46	78.09	77.72		82.20	80.79	80.53	79.92	79.57	79.25	
	0.2011	77.69	77.50	77.41	77.25	76.89	76.46		78.98	78.83	78.62	78.51	78.07	77.66	
	0.4005	79.55	79.24	79.11	79.00	78.48	78.02		80.91	80.58	80.17	79.98	79.53	79.10	
	0.6006	81.43	81.09	80.86	80.55	80.16	79.73		82.72	82.31	81.71	81.43	81.10	80.63	
	0.8017	83.32	82.72	82.46	82.02	81.83	81.33		84.65	84.04	83.23	82.87	82.56	82.09	
298.15	0.0508	82.49	81.89	81.26	80.64	80.05	79.37	318.15	85.47	83.23	82.90	82.01	81.54	80.87	
	0.0812	80.96	80.58	79.96	79.52	79.07	78.62		83.57	81.88	81.56	81.00	80.51	79.95	
	0.0991	80.26	79.81	79.24	78.91	78.50	78.16		82.60	81.12	80.80	80.38	79.9	79.37	
	0.2011	78.04	77.89	77.73	77.61	77.21	76.80		79.35	79.18	78.91	78.82	78.37	77.90	
	0.4005	79.91	79.67	79.36	79.25	78.88	78.37		81.33	80.87	80.40	80.24	79.85	79.39	
	0.6006	81.78	81.43	80.96	80.81	80.49	80.04		83.16	82.70	81.91	81.62	81.36	80.78	
	0.8017	83.68	83.19	82.55	82.32	82.12	81.62		85.11	84.37	83.43	83.08	82.79	82.22	

**Tabla 3.** Volúmenes molares aparentes límites  $v_{\phi}^0$  del ácido DL-2-aminobutírico en seis (6) solventes pseudobinarios a diferentes temperaturas.

Solvente pseudobinario		I		II		III		IV		V		VI	
T (K)		$V_{\phi}^0$	$S_v$	$V_{\phi}^0$	$S_v$	$V_{\phi}^0$	$S_v$	$V_{\phi}^0$	$S_v$	$V_{\phi}^0$	$S_v$	$V_{\phi}^0$	$S_v$
283.15		74.66	8.12	74.63	7.81	74.60	7.49	74.43	7.30	73.91	7.71	73.49	7.45
288.15		74.90	8.34	74.87	7.80	74.84	7.51	74.76	7.17	74.25	7.36	73.84	7.22
293.15		75.29	8.18	75.24	7.55	75.22	7.25	75.18	6.84	74.69	7.06	74.28	6.94
298.15		75.64	8.18	75.61	7.64	75.58	6.96	75.54	6.67	75.06	7.00	74.65	6.88
303.15		75.96	8.15	75.92	7.69	75.90	6.88	75.85	6.45	75.37	6.73	74.95	6.65
308.15		76.31	8.01	76.28	7.46	76.26	6.64	76.21	6.21	75.72	6.38	75.33	6.35
313.15		76.60	8.19	76.58	7.49	76.57	6.50	76.52	6.12	76.03	6.33	75.64	6.20
318.15		76.95	8.34	76.90	7.52	76.88	6.33	76.86	5.92	76.37	6.21	75.97	5.94

Los valores positivos de  $S_v$  para las mezclas del ácido DL-2-aminobutírico sugieren que el coeficiente volumétrico virial par es dominado por las interacciones de los grupos funcionales cargados  $NH_2^+$  y  $COO^-$  del ácido DL-2-aminobutírico con los iones  $Na^+$  y  $NO_3^-$  del  $NaNO_3$ . Los valores de los volúmenes aparentes límites  $v_{\phi}^0$  son positivos para todas las temperaturas en todos los solventes. Ellos se incrementan al aumentar la temperatura, y disminuyen con el incremento de la concentración del  $NaNO_3$  en cada solvente pseudobinario. Este último hecho podría ser debido al incremento de las interacciones soluto-solvente.<sup>2</sup>

Por otra parte, los valores de los volúmenes molares aparentes límites  $v_{\phi}^0$  fueron

correlacionados con temperatura usando la ecuación (3), con el propósito de evaluar las segundas derivadas de este volumen con respecto a la temperatura, a fin de discernir acerca de la hidrofobicidad o hidrofiliidad del ácido DL-2-aminobutírico en los diferentes sistemas pseudobinarios examinados.

$$V_{\phi}^0 = A + BT + CT^2 \quad (3)$$

En esta ecuación A, B y C son parámetros ajustables y T es la temperatura de trabajo. Los valores de  $\partial^2 V_{\phi}^0 / \partial T^2$  se obtuvieron derivando la ecuación anterior y se presentan en la tabla 4.

**Tabla 4.** Valores de la  $\partial^2 V_{\phi}^0 / \partial T^2$  del ácido DL-2-aminobutírico en seis (6) solventes pseudobinarios.

Solvente pseudobinario	I	II	III	IV	V	VI
$\partial^2 V_{\phi}^0 / \partial T^2$	-1.40E-05	-2.00E-05	-4.00E-05	-4.00E-04	-6.00E-04	-6.00E-04
$\sigma$	2.10E-06	2.85E-06	2.84E-06	1.89E-05	2.20E-05	2.21E-05

observa, los valores de  $\partial^2 V_{\phi}^0 / \partial T^2$  del ácido DL-2-aminobutírico son negativos en todos los solventes pseudobinarios, lo cual sugiere, de acuerdo con Hepler,<sup>8</sup> que el ácido DL-2-aminobutírico se comporta como un soluto disruptor de la estructura del solvente.

Adicionalmente, los volúmenes molares de transferencia a dilución infinita  $\Delta_{tr} V_{\phi}^0$  del ácido DL-2-aminobutírico desde el agua pura hasta los distintos solventes pseudobinarios fueron obtenidos utilizando la ecuación (4):

$$\Delta_{tr} V_{\phi}^0 = V_{\phi}^0 (\text{solvente pseudobinario}) - V_{\phi}^0 (\text{En agua}) \quad (4)$$

Los resultados obtenidos para los  $\Delta_{tr} V_{\phi}^0$  se muestran en la tabla 5. Puede observarse que ellos resultaron ser negativos a todas las temperaturas y que disminuyen con el incremento de la concentración de  $\text{NaNO}_3$  en el solvente pseudobinario. Es conocido que el estado de dilución infinita se caracteriza por la ausencia de las interacciones soluto-soluto. Entonces, los volúmenes de transferencia proporcionan información acerca de la interacción soluto-solvente.<sup>4,9</sup>

**Tabla 5.** Volúmenes molares de transferencia  $\Delta_{tr} V_{\phi}^0$  para el ácido DL-2-aminobutírico en seis solventes pseudobinarios a las temperaturas de: 283.15, 288.15, 293.15, 298.15, 303.15, 308.15, 313.15 y 318.15 K.

T (K)	283.15	288.15	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15	318.15
Solvente pseudobinario	$\Delta_{tr} V_{\phi}^0 = V_{\phi}^0$ (en solución acuosa de $\text{NaNO}_3$ ) - $V_{\phi}^0$ (en agua)							
I	-0.05	-0.01	-0.21	-0.06	-0.04	-0.04	-0.15	-0.14
II	-0.08	-0.04	-0.26	-0.09	-0.08	-0.07	-0.17	-0.19
III	-0.11	-0.07	-0.28	-0.12	-0.10	-0.09	-0.18	-0.21
IV	-0.28	-0.15	-0.32	-0.16	-0.15	-0.14	-0.23	-0.23
V	-0.80	-0.66	-0.81	-0.64	-0.63	-0.63	-0.72	-0.72
VI	-1.22	-1.07	-1.22	-1.05	-1.05	-1.02	-1.11	-1.12

Por otra parte, de acuerdo con el modelo de coesferas solapadas propuesto por Frank y Evans,<sup>3,10</sup> y en virtud, a que en la solución formada por el ácido DL-2-aminobutírico y la solución acuosa de NaNO<sub>3</sub>, las interacciones dominantes son las que se establecen entre los iones de la sal y la parte apolar (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) del aminoácido;<sup>11</sup> se puede inferir que efecto neto de este comportamiento, produce un aumento de moléculas de agua liberadas desde la coesferas de los iones de la sal y del aminoácido hacia la fase voluminosa, produciéndose una disminución en la estructura del agua, dando lugar a un volumen de transferencia negativo.

Estos resultados permiten concluir que el ácido DL-2-aminobutírico se comporta como un soluto disruptor de la estructura tridimensional del agua en soluciones de NaNO<sub>3</sub>, además este hecho es consistente con los resultados encontrados para  $\partial^2 V_\phi^0 / \partial T^2$  aplicando el criterio de Hepler.<sup>8</sup>

En adición a lo anterior, los volúmenes molares aparentes límites  $v_\phi^0$  para el ácido DL-2-aminobutírico pueden ser considerados como el resultado de la suma del volumen de van der Waals ( $V_{vW}$ ), el volumen asociado con los huecos o espacios vacíos  $V_v$  y el volumen de contracción debido a la electrostricción  $V_s$ .<sup>11,12</sup> Asumiendo que  $V_{vW}$  y  $V_v$  tienen la misma magnitud en agua que en soluciones acuosas para la misma clase de solutos,<sup>13</sup> los valores de  $\Delta_{tr} v_\phi^0$  se pueden explicar de acuerdo al cambio en el volumen de contracción debido al efecto de electrostricción. Según esto, en nuestro caso, la presencia de NaNO<sub>3</sub> en cada solvente pseudobinario potencia el efecto de electrostricción causado por la presencia del ácido DL-2-aminobutírico en cada solvente. Por otra parte, este efecto se debe reflejar en los valores del número de hidratación.

Los números de hidratación  $N_H$  para el ácido DL-2-aminobutírico para solvente pseudobinario, a las distintas temperaturas de trabajo, se calcularon con ayuda del modelo propuesto por Millero,<sup>14,15</sup> con ayuda de la ecuación (5):

$$\bar{V}_2^0 = \bar{V}_{2int}^0 + \bar{V}_{2elect}^0 \quad (5)$$

Donde  $\bar{v}_2^0$  es el volumen a dilución infinita obtenido experimentalmente;  $\bar{V}_{2int}^0$  es el volumen molar parcial intrínseco del ácido DL-2-aminobutírico, el cual se puede expresar como la adición del volumen de van der Waals y el volumen debido al efecto de empaquetamiento;  $\bar{V}_{2elect}^0$  es el volumen molar parcial de electrostricción debido a la hidratación del aminoácido.

La sustitución en esta ecuación de las expresiones para  $\bar{V}_{2int}^0$  y  $\bar{V}_{2elect}^0$  dadas por este formalismo por las ecuaciones (6) y (7), permite evaluar los números de hidratación, tal como se detalla en el siguiente párrafo: .

$$\bar{V}_{2int}^0 = \left( \begin{array}{c} 0,7 \\ 0,634 \end{array} \right) \bar{V}_{2crystal}^0 \quad (6)$$

Donde  $\bar{V}_{crystal}^0$  es el volumen molar de los cristales del aminoácido y se obtiene dividiendo la masa molecular del ácido DL-2-aminobutírico entre su densidad en estado puro.

$$\bar{V}_{2elect}^0 = N_H (\bar{V}_E^0 - \bar{V}_B^0) \quad (7)$$

Donde  $N_H$  es el número de hidratación,  $\bar{V}_E^0$  es el volumen molar del agua en la esfera de hidratación y  $\bar{V}_B^0$  es el volumen molar del agua natural. No obstante a que Millero<sup>14</sup> evaluó esta diferencia  $\bar{V}_E^0 - \bar{V}_B^0$  originalmente para aminoácidos en agua, esta ha sido utilizada también en solventes acuosos mixtos.<sup>9-11,13</sup> Este tratamiento asume que, por cada molécula de agua que pasa desde la fase voluminosa hasta la región cercana al aminoácido, el volumen decrece en esa cantidad  $\bar{V}_E^0 - \bar{V}_B^0$ . En el presente artículo, mediante un procedimiento de interpolación y usando para esta diferencia los valores reportados por Yan,<sup>9</sup> de -2.9, -3.3, -4.0 cm<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup> a 288.15, 298.15 y 308.15 K, respectivamente; se obtuvieron los valores de -2.7, -3.1, -3.6, -4.6 y -5.9 cm<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup> a las temperaturas de 288.15, 298.15 y 308.15 K, respectivamente.<sup>2</sup> Conociendo el volumen de electrostricción es posible determinar el número de moléculas hidratadas alrededor del aminoácido o número de hidratación utilizando la ecuación (7).<sup>2</sup>

Por consiguiente, en este trabajo después de remplazar las ecuaciones (6) y (7) en la ecuación (5), se evaluaron los números de hidratación  $N_H$  del ácido DL-2-aminobutírico y los resultados se muestran en la tabla 6.

**Tabla 5.** Número de hidratación  $N_H$  del ácido DL-2-aminobutírico en solventes pseudobinarios a diferentes temperaturas.

$T$ (K)	Solvente pseudobinario					
	I	II	III	IV	V	VI
283.15	-12.3	-12.2	-12.2	-12.2	-12.0	-11.8
288.15	-11.5	-11.5	-11.5	-11.4	-11.3	-11.1
293.15	-10.9	-10.9	-10.9	-10.8	-10.7	-10.5
298.15	-10.3	-10.3	-10.3	-10.3	-10.1	-10.0
303.15	-9.6	-9.5	-9.5	-9.5	-9.4	-9.3
308.15	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.5	-8.4
313.15	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.5	-7.4
318.15	-6.0	-5.9	-6.0	-6.0	-5.9	-5.8

Del análisis de estos resultados, es evidente que los números de hidratación  $N_H$  de ácido DL-2-aminobutírico en las mezclas acuosas de  $\text{NaNO}_3$  permanecen prácticamente constantes conforme aumenta la concentración del cosolvente, y disminuyen en valor absoluto con el aumento de la temperatura. Este hecho plantea que en este sistema, las interacciones entre el ácido DL-2-aminobutírico y los iones del cosolvente alcanzan una especie de “saturación”, la cual congela, por así decirlo, al efecto de electrostricción sobre las moléculas de agua; mientras que el aumento de la temperatura contribuye con la deshidratación de las especies solvatadas.

## CONCLUSIONES

En este estudio se obtuvieron datos volumétricos para el ácido DL-2-aminobutírico en seis solventes pseudobinarios a diferentes concentraciones. Los volúmenes molares aparentes límites  $v_\phi^0$  resultaron positivos, y disminuyen con el aumento de la concentración del  $\text{NaNO}_3$  en el solvente pseudobinario e incrementan con el aumento de la temperatura. La segunda derivada de  $v_\phi^0$ , con respecto a la temperatura, muestra que el ácido DL-2-aminobutírico se comporta como un soluto disruptor de la estructura del solvente pseudobinario. Los volúmenes molares aparentes de transferencia a dilución infinita sugieren que las interacciones dominantes se establecen entre los iones de la sal y la parte apolar ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) del ácido DL-2-aminobutírico, con una disminución de la estructura del agua alrededor de los grupos ion-hidrofóbicos. Finalmente, los resultados de los números de hidratación  $N_H$  muestran un efecto de deshidratación a medida que se incrementan los valores de temperatura; sin embargo, este parámetro no mostró sensibilidad a los cambios en los valores de la concentración del  $\text{NaNO}_3$  en el solvente pseudobinario.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Universidad de Córdoba por el apoyo prestado para la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shekaari H, Jebali F. Densities and electrical conductances of amino acids + ionic liquid ([Hmim]Br) +H<sub>2</sub>O mixtures at 298.15K. *Fluid Phase Equilib.* 2010; 295: 68-75. doi: 10.1016/j.fluid.2010.04.002.
2. Páez F, Páez M, Portacio, A. Interacciones de la glicina en soluciones acuosas de tetrafluoroborato de 1-butil. 3-metilimidazolío a diferentes temperaturas. *Quim Nova.* 2014; 37(3): 418-425. doi.org/10.5935/0100-4042.20140078.
3. Siddique J, Naqvi S. Volumetric behavior on interactions of -amino acids with sodium acetate, potassium acetate, and calcium acetate in aqueous solutions. *J. Chem Eng Data.* 2010; 55: 2930-2934. doi:10.1021/je100190e.

4. Pal A, Chauhan N. Volumetric behaviour of amino acids and their group contributions in aqueous lactose solutions at different temperatures. *J Chem Thermodyn.* 2011; 43: 140-146. doi:10.1016/j.jct.2010.08.004.
5. Banipal P, Kaur J, Banipal T, Singh K. Study of interactions of L-aspartic acid and L-glutamic acid with some metal acetates through volumetric behaviour over the temperature range (288.15 to 318.15) K. *J Chem Thermodyn.* 2010; 40: 1166-1185. doi:10.1016/j.jct.2008.02.007.
6. Páez M, Cantero P, Marzola J. Densidades y propiedades volumétricas de la glicina en soluciones acuosas de tiosulfato de sodio pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a diferentes temperaturas. *Rev Colomb Quim.* 2012; 41(3): 449-484.
7. Armarego WLF, Chai C. Purification of laboratory chemicals. 6th Edition. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2009.
8. Hepler L. Thermal expansion and structure in water and aqueous solutions. *Can J Chem.* 1969; 47: 4613. doi:10.1139/v69-762.
9. Yan Z, Wang J, Kong W, Lu J. Effect of temperature on volumetric and viscosity properties of some amino acids in aqueous calcium chloride solutions. *Fluid Phase Equilib.* 2004; 215: 143. doi:10.1016/j.fluid.2003.07.001.
10. Liu C. Volumetric Properties of Amino Acids in Aqueous N-methylacetamide Solutions at 298.15 K. *J Solution Chem.* 2010; 39: 1253-1263, doi:10.1007/s10953-010-9585-y.
11. Tome L, Domínguez M, Cláudio A, Freire M, Marrucho I, Cabeza O, Coutinho J. On the Interactions between Amino Acids and Ionic Liquids in Aqueous Media. *J Phys Chem B.* 2009; 113: 13971-13979, doi:10.1021/jp906481m.
12. Natarajan M, Wadi RK, Gaur HC. Apparent molar volumes and viscosities of some  $\alpha$ - and  $\alpha,\omega$ -amino acids in aqueous ammonium chloride solutions at 298.15 K. *J Chem Eng Data.* 1990; 35(1): 87-93. doi:10.1021/je00059a024.
13. Palani R, Balakrishnan S, Arumugam G. Ultrasonic Studies of Amino Acids in Aqueous Sucrose Solution at Different Temperatures. *J Phys Sci.* 2011; 22: 131-141. <http://web.usm.my/jps/22-1-11/22.1.9.pdf>.
14. Millero F. J, Surdo L. A, Shin C. The apparent molal volumes and adiabatic compressibilities of aqueous amino acids at 25 °C. *J Phys Chem.* 1978; 82: 784-792. doi:10.1021/j100496a007.
15. Choudhary S, Kishore N. Thermodynamics of the interactions of a homologous series of some amino acids with trimethylamine N-oxide: Volumetric, compressibility and calorimetric studies. *J Chem Thermodyn.* 2011; 43: 1541-1551, doi: 10.1016/j.jct.2011.05.012.



## INFORMACIONES

### XXVIII CONGRESO PERUANO DE QUÍMICA

“Dr. Gastón Pons Muzzo”

Del 29 al 31 de Marzo del 2017

La Sociedad Química del Perú, estando próxima a cumplir 83 años de creación, busca promover el conocimiento, fomentar la investigación intra e interdisciplinarias, innovación, tecnología, difusión científica y motivando a emprender nuevos retos en las diferentes ramas de la Química y Ciencias afines, por tal motivo organiza el XXVIII Congreso Peruano de Química, a realizarse del 29 al 31 de Marzo del 2017 en el Auditorio de la Facultad de Química e Ing. Química de la UNMSM.

Los invitamos a compartir e intercambiar sus ideas, conocimientos, investigaciones e innovaciones, a crear relaciones en este espacio abierto a la comunidad científica, académica, estudiantil, empresarial. Contaremos con plenarias, conferencias, simposios, cursos pre congreso, sesiones de póster y actividades culturales, así como nuestra Expoquímica integrada por empresas asociadas con el sector.

Compartiremos resultados de investigación durante la celebración del congreso, que permitirá destacar la importancia de la química en el desarrollo sostenible con la eficiencia en el uso de los recursos y su impacto ambiental.

La Sociedad Química y el comité organizador en colaboración con nuestros socios, esperamos contar con su asistencia.

#### PONENTES INTERNACIONALES

- Dr. Alejandro Cifuentes Gallego  
Laboratory of Foodomics CIAL  
National Research Council of Spain (CSIC)
- Dra. Elena Ibañez Ezequiel  
Research Professor Foodomics CIAL  
Laboratory Bioactivity and Food Analysis Department Institute of  
Food Science Research (CIAL-CSIC) Madrid – Spain.

#### RESÚMENES DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

Los resúmenes de los trabajos de investigación que se presenten deberán ser originales y versar sobre temas relacionados a las diferentes secciones del Congreso.

El formato debe ser solicitado y entregado al correo electrónico [resumencpq2017@gmail.com](mailto:resumencpq2017@gmail.com).

Las dimensiones del panel serán 120 cm de alto y 100 cm de ancho.

## SECCIONES DE CONGRESO

\* Educación Química \* Química Analítica \* Química Inorgánica \* Química Orgánica y Productos Naturales \* Fisicoquímica \* Química Teórica y Computacional \* Bioquímica \* Química de los materiales y nanotecnología \* Agroquímica y Química de los Alimentos \* Química Industrial \* Química Biológica y Biotecnología \* Química Ambiental \* Química Médica \* Química de Polímeros \* Química Farmacéutica y Cosmética \* Síntesis Química.

## FECHAS IMPORTANTES

31 de Octubre 2016	Límite para recepción de resúmenes de investigación
9-20 de diciembre 2016	Comunicación a los autores sobre la aceptación del resumen enviado
30 de enero 2017	Límite de recepción del Trabajo de Investigación
31 de enero 2017	Límite para inscripción de autores de trabajos de investigación aceptados al Congreso con tarifa especial.

## INFORMES E INSCRIPCIONES

Sociedad Química del Perú  
Av. Nicolás de Aranibar 696, Santa Beatriz, Lima 01.  
**Teléfono:** 472-3925. **Correo:** sqperu@gmail.com  
**Página web:** www.sqp.org.pe  
Atención de lunes a viernes de 10:00 a 13:00 y de 15:30 a 18:30 horas.





# **XXVIII CONGRESO PERUANO DE QUÍMICA**

Marzo 2017, Lima - Perú