

# REVISTA DE LA ACADEMIA COLOMBIANA de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

LA ACADEMIA ES ÓRGANO CONSULTIVO DEL GOBIERNO NACIONAL

VOLUMEN XXXV

SEPTIEMBRE DE 2011

NÚMERO 136

DIRECTORA DE LA REVISTA: MARGARITA PEREA DALLOS



## CONTENIDO - CONTENTS

	Pág.		Pág.
<b>Bioquímica (Biochemistry)</b>		[Rapid construction of a library of natural products from the culture of 14 bacteria of the <i>phylum</i> Firmicutes, symbionts of the octocoral <i>Pseudopterogorgia elisabethae</i> from Providencia Island (South-west Caribbean)]	
Obtención de un sub-proteoma de citoplasma de una línea celular de trofoblasto mediante fraccionamiento con detergentes [Obtention of cytoplasm sub-proteome of a trophoblast cell line by detergent fractionation]		<i>Hebelin Correa, Fabrice Berrué, Brad Haltli, Carmenza Duque, Russell Kerr</i> .....	337
<i>Sandra Susana Novoa-Herrán, Myriam Sánchez-Gómez</i> .....	277	<b>Química Ambiental (Environmental Chemistry)</b>	
Anti-tumor effects of simvastatin on UMR-106 osteosarcoma cell line		Actividad Microbiana en Suelos y Sedimentos en el sistema Córdoba Juan Amarillo, Bogotá D.C.	
[Efectos antitumorales de la simvastatina sobre la línea celular de osteosarcoma UMR-106]		[Microbial Activity in Soils and Sediments for the Córdoba Juan Amarillo system, Bogotá D.C.]	
<i>María Claudia Sandoval-Usme, Natalia Ordóñez, Adriana Umaña-Pérez, Leandro Fernández-Pérez, Myriam Sánchez-Gómez</i> .....	287	<i>Laura Emilia Cerón Rincón, Eduardo Ramírez Valencia</i> .....	349
<b>Catálisis (Catalysis)</b>		Caracterización química de la materia orgánica natural del río Pasto	
Degradación fotocatalítica de fenol empleando arcillas pilariadas con Al-Fe y Al-Cu		[Chemical characterization of natural organic matter in Pasto river]	
[Photocatalytic degradation of phenol using Al-Fe and Al-Cu pillared clays]		<i>Milton Rosero Moreano, Cristina Nerín de la Puerta, Gonzalo Taborda Ocampo, Gloria Rodríguez Martínez</i> .....	363
<i>Jury Nungo-Moreno, J. G. Carriazo, S. Moreno, R. A. Molina</i> .....	295	<b>Química Analítica (Analytical Chemistry)</b>	
<b>Fisicoquímica (Physicochemical)</b>		Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de cinco variedades de cacao colombiano	
Caracterización fisicoquímica de un biomaterial marino con fines de restauración de bienes culturales		[Comparative study by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography of catechines extracted from five varieties of Colombian cacao]	
[Physicochemical characterization of marine biomaterial for restoration of cultural heritage]		<i>Mónica Cala, Ángela Vásquez, Alejandro García, Jairo René Martínez, Elena Stashenko</i> .....	371
<i>Aida Liliana Barbosa L., Lucía Carmona</i> .....	303	Obtención de extractos de jengibre ( <i>Zingiber officinale</i> ) empleando CO <sub>2</sub> supercrítico	
Study of some volumetric properties of glycerol formal + ethanol mixtures and correlation with the Jouyban-acree model		[Obtention of ginger ( <i>Zingiber officinale</i> ) extracts by supercritical CO <sub>2</sub> ]	
[Estudio de algunas propiedades volumétricas de mezclas glicérol formal + etanol y correlación con el modelo Jouyban-acree]		<i>Armando Reyes-Najar, Henri I. Castro-Vargas, Luis I. Rodríguez-Varela, Clara E. Quijano-Celis, Fabián Parada-Alfonso</i> .....	381
<i>Andrés R. Holguín, Daniel R. Delgado, Fleming Martínez, Mehri Khoubnasabjafari, Abolghasem Jouyban</i> .....	315	<b>Química de Materiales (Materials Chemistry)</b>	
Performance of the Jouyban-acree and Yalkowsky-Roseman models for estimating the solubility of indomethacin in ethanol + water mixtures		Carbones activados a partir de bagazo de caña de azúcar y zuro de maíz para la adsorción de cadmio y plomo	
[Desempeño de los modelos de Jouyban & Acree y Yalkowsky & Roseman en la estimación de la solubilidad de indometacina en mezclas cosolventes etanol + agua]		[Activated carbon from sugarcane bagasse and corn cob for the adsorption of cadmium and lead]	
<i>Miller A. Ruíz Díaz, Daniel R. Delgado, Fleming Martínez</i> .....	329	<i>Oliva Primera-Pedrozo, Fredy Colpas-Castillo, Edgardo Meza-Fuentes, Roberto Fernández-Maestre</i> .....	387
<b>Productos Naturales (Natural Products)</b>		<b>Constitución de la Academia</b>	
Rápida construcción de una librería de los productos de cultivo de 14 bacterias del <i>phylum</i> Firmicutes simbioses del octocoral <i>Pseudopterogorgia elisabethae</i> de la isla de Providencia (Caribe Sur-Occidental)		(Members of the Academy) .....	397
		<b>Publicaciones de la Academia</b>	
		(Publications of the Academy) .....	401

**D**esde el inicio del universo hace aproximadamente 5.000 millones de años, ya la química estaba haciendo parte del proceso de su formación. Las partículas inicialmente originadas se unieron para formar átomos, y éstos se integraron para producir moléculas, las cuales fueron poco a poco formando estructuras y supraestructuras de conjuntos organizados, hasta que surge la vida, apareciendo en una secuencia evolutiva asombrosa millones y millones de virus, microorganismos, y seres vegetales y animales, poblando nuestro planeta tierra. La química continúa rigiendo estos procesos evolutivos hasta que de la animalidad surgieron nuestros ancestros dando origen a la especie humana tal como la conocemos hoy en día.

Trasladándonos hacia el presente la química sigue acompañándonos en nuestra vida cotidiana, y como se dice en el argot popular en ciencia, su omnipresencia es una constante aunque ésta nos parezca desapercibida. No podemos concebir el mundo que nos rodea sin el conocimiento de los demás seres vivos que comparten con nosotros este planeta tierra, sin los avances en alimentos y las tecnologías de transformación y conservación, sin los plásticos, cauchos y fibras sintéticas, sin la agricultura y sus adelantos por ejemplo en semillas genéticamente mejoradas o transgénicas, sin la petroquímica, sin los medios de transporte actuales, como automóviles, trenes rápidos, aviones, naves espaciales, sin los extraordinarios avances en los medios de comunicación, sin el mundo de las pinturas, sin la energía, sin la vivienda, sin la salud y los medicamentos basados todos en el aislamiento de compuestos químicos de origen natural o en la preparación de compuestos sintéticos en el laboratorio, y así podríamos seguir añadiendo muchísimas actividades más que van conformando una lista que parece no tener fin.

Por estas razones, en el año 2006 la International Journal of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) reconoce el papel central y los efectos significativos que las disciplinas científicas entre ellas la química, han hecho en beneficio de la humanidad, reconocimiento que luego fue ratificado por la UNESCO y la ONU en el año 2008. En este contexto, la ONU emite en Diciembre de 2008 una declaración donde oficialmente ratifica lo anteriormente mencionado y además establece el concepto del Año Internacional de la química para el 2011, por las importantes y significativas contribuciones de la química a lo largo de la historia de nuestro mundo y de nuestro desarrollo como seres vivos. Se establecen también como objetivos de esta importante celebración los siguientes: llamar la atención del público en general en el sentido de aumentar el conocimiento y el aprecio por esta ciencia; contribuir en el campo educativo en áreas tan importantes como la Salud y el Ambiente incrementando el interés de los jóvenes por la química y su incidencia en estas áreas; generar entusiasmo por el futuro trabajo creativo en química (su desarrollo es no solo descubrir sino también crear), el futuro de la humanidad se basa en el entendimiento del mundo que nos rodea, lo cual es posible gracias a la química; y finalmente para recordar el centenario del premio Nobel otorgado a Marie Sklodowska Curie por el descubrimiento del Radio y del Polonio y los cien años de las asociaciones internacionales de química.

Para esta celebración la comunidad científica colombiana y mundial participamos de muchas maneras. La forma escogida en esta extraordinaria ocasión por la Academia Colombiana de Ciencias

Exactas, Físicas y Naturales, ha sido la de dedicar un número especial de su revista el 136, del volumen XXXV, para la publicación de artículos científicos en Química y áreas relacionadas preparados por algunos de los mejores grupos de investigación de Colombia, con o sin cooperación internacional, en áreas tales como la Bioquímica, Catálisis, Fisicoquímica, Materiales, Productos Naturales, Química Ambiental y Química Analítica.

Los artículos seleccionados para esta ocasión permitirán a los lectores hacerse una idea de avances recientes en investigación, conocer sus principales contribuciones al conocimiento en general y a la tecnología e innovación, sus aportes a la formación del capital intelectual del país y sobre todo los planes para el futuro de esta importante ciencia, los cuales hacen parte del plan de vida y de los sueños de los químicos y demás científicos de áreas relacionadas en Colombia.

Finalmente, la Academia quiere unirse a todos los científicos y a la gente del común para enviar un claro mensaje que conecta nuestra comprensión del mundo con nuestro conocimiento de la química, así como con nuestra capacidad para planear y establecer los procesos de investigación científica que usando su fuerza creadora hacen y harán posible los extraordinarios avances responsables de la transformación de nuestra vida en procesos más cómodos y amables.

**Carmenza Duque Beltrán**  
Editora Invitada

# OBTENCIÓN DE UN SUB-PROTEOMA DE CITOPLASMA DE UNA LÍNEA CELULAR DE TROFOBLASTO MEDIANTE FRACCIONAMIENTO CON DETERGENTES

Sandra Susana Novoa-Herrán<sup>1</sup>, Myriam Sánchez-Gómez<sup>2\*</sup>

## Resumen

**Novoa-Herrán, S. S., M. Sánchez-Gómez:** Obtención de un sub-proteoma de citoplasma de una línea celular de trofoblasto mediante fraccionamiento con detergentes. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **35** (136): 277-285, 2011. ISSN 0370-3908.

El método de fraccionamiento con detergentes descrito por **Rambsy** y **Makowski** en 1999, fue modificado utilizando un buffer con digitonina (0,015%) para permeabilizar células HTR8/SVneo de trofoblasto humano, extrayendo las proteínas de citoplasma en la fracción soluble y solubilizando las de membrana a partir del precipitado con un buffer con Tritón X-100 (0,5%). Se obtuvo un extracto reproducible de proteínas citoplasmáticas libre de proteínas de membrana y se adecuó para electroforesis bidimensional (2-DE) por precipitación con clorofomo/metanol. En conclusión, el método aquí descrito resulta adecuado para la obtención de sub-proteomas de citoplasma a partir de líneas celulares, con una reproducibilidad y recuperación óptimas para el análisis de perfiles proteómicos por electroforesis bidimensional.

**Palabras clave:** Proteómica, fraccionamiento celular, Tritón X-100, digitonina, trofoblasto, HTR8/SVneo.

## Abstract

The differential detergent fractionation method described by **Rambsy** and **Makowski** in 1999, was modified using a digitonin (0.015%) buffer to permeate HTR8/SVneo human trophoblast cells and obtain the cytoplasm proteins in the soluble fraction, while membrane proteins were dissolved from the pellet with Triton X-100 (0.5%) buffer. We obtained a reproducible membrane-free cytoplasm protein extract suitable for 2-DE, by chloroform/methanol precipitation. In conclusion, the method here described is appropriate for the separation of cytoplasm sub-proteomes from cell cultures, with an optimal reproducibility and recovery to perform proteomic profile analysis by bidimensional electrophoresis.

**Key words:** Proteomic, cell fractionation, Triton X-100, digitonine, trophoblast, HTR8/SVneo.

<sup>1</sup> Estudiante de doctorado.

<sup>2</sup> Profesor Titular. Grupo de Investigación en Hormonas, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. Cra. 30 45-03, Bogotá D.C., Colombia. Correo electrónico: mysanchezd@unal.edu.co.

\* Autor para correspondencia.

## Introducción

Durante el primer trimestre de embarazo se desarrolla el trofoblasto como parte importante de la placenta. El trofoblasto, especialmente el citotrofoblasto extraveloso (EVT), comparte muchas características con células cancerosas, como el alto nivel de proliferación, migración e invasión; sin embargo, la función del trofoblasto se encuentra altamente controlada a diferencia de las células malignas (**Ferretti, Bruni et al.** 2007). Por lo anterior, es de interés estudiar el perfil de proteínas expresadas por el trofoblasto, con miras a identificar la desregulación que tiene lugar en el desarrollo maligno. Solo un enfoque proteómico permite captar la globalidad del sistema y la detección de proteínas hasta ahora no reportadas en este modelo.

La proteómica es una disciplina que ha emergido dentro de las técnicas bioquímicas para ayudar a revelar los mecanismos bioquímicos y fisiológicos celulares y en particular de enfermedades complejas, donde se permite la comparación cualitativa y cuantitativa de todas las proteínas expresadas por una célula bajo determinadas condiciones. La electroforesis bidimensional es una de las técnicas de proteómica más usada actualmente para la separación de mezclas complejas de proteínas, la cual en asociación con técnicas de análisis de imágenes e identificación de proteínas por espectrometría de masas, permite analizar un perfil proteico particular (**Reiner Westermeier**, 2008). No obstante, la complejidad de las muestras y el rango dinámico tan amplio de los extractos proteicos representa un desafío analítico a la hora de separar y analizar proteomas.

Las proteínas de membrana desarrollan un papel muy importante en señalización celular, adaptación a ambientes, e interacciones célula-matriz y célula-célula, y además, están probablemente involucradas en la adquisición y mantenimiento de propiedades metastásicas e invasivas de células tumorales. Las proteínas de membrana representan más del 50% de los principales blancos terapéuticos actuales. Son pocos los estudios desarrollados sobre proteínas de membrana asociadas a cáncer, dentro de ellos se pueden destacar los siguientes: cáncer de seno (**Liang**, 2006; **Dowling**, 2007), carcinoma nasofaríngeo (**Zhang**, 2008), tejidos de tiroides malignos y benignos, células no cancerosas como las células madre mesenquimales humanas (**Foster**, 2005), neutrófilos (**Jethwaney**, 2007) y queratinocitos (**Gonnet**, 2003). Dichos estudios han reportado la expresión diferencial de proteínas o la identificación de todas las proteínas de membrana extraídas. Sin embargo, el estudio de proteínas de membrana es un desafío, presentando dos problemas principales: su baja abun-

dancia relativa y su pobre solubilidad en medios acuosos (**Vertommen, Panis et al.** 2011).

Para analizar mejor un proteoma es necesario realizar un fraccionamiento previo, con el que se logre reducir la complejidad de la muestra, mejorando la separación y evitando la superposición de proteínas abundantes, y en consecuencia incrementando considerablemente el número de identificaciones. Existen diferentes técnicas para realizar este fraccionamiento, la mayoría orientadas a extractos bacterianos o con pasos que involucran ultracentrifugación (**Payrastra, Plantavid et al.** 1988; Selinsky 2003; **Roobol-Bóza, Dolby et al.** 2004; **Everberg, Leiding et al.** 2006), pero son pocas las que se refieren a extractos de líneas celulares humanas. Dentro de las técnicas que permiten trabajar células eucariotas, está la desarrollada por Ramsby y Makowski en 1999 (**Walker**, 2005). Las ventajas de este método es que es simple y altamente reproducible, no requiere pasos de ultra centrifugación, preserva la integridad de los filamentos de la red del citoesqueleto y es especialmente útil para cantidades limitadas de biomaterial; además, se obtiene cada fracción de forma soluble y no precipitada, cuya solubilización es causa de problemas, especialmente para proteínas de membrana (**McCarthy, Burgess et al.** 2005). Este método fue implementando en este trabajo, y con el objetivo de mejorar la recuperación de proteínas se modificaron los tiempos de incubación, y se implementaron una serie de lavados tendientes a la limpieza de cada fracción y a aumentar la recuperación de proteína.

Otro punto importante en la obtención de proteomas, es la limpieza de la muestra previa al análisis por isoelectroenfoque. Es necesario eliminar el exceso de sales y lípidos, así como concentrar la muestra y disponerla en el buffer de isoelectroenfoque, para que esta pueda ser correctamente separada en función de su punto Isoeléctrico (pI). Existen diversas técnicas de purificación por precipitación; aunque en general se tiene una baja recuperación, es necesario verificar que no haya falta de reproducibilidad ni una pérdida selectiva o heterogénea de proteína durante estas pérdidas.

Debido a que la línea de trofoblasto, HTR8/SVneo, es un modelo interesante para comprender la patología del cáncer, la obtención de sub-proteomas de membrana y de citoplasma y su análisis por electroforesis bidimensional es de gran interés, siendo este el objetivo del presente trabajo.

## Materiales y métodos

### Cultivo celular

La línea celular de citotrofoblasto extraveloso HTR8/SVneo fue donada por la Dra. Ángela Cadavid de la Uni-

versidad de Antioquia. Esta línea celular fue desarrollada de un cultivo de explante de placenta humana de primer trimestre e inmortalizada por transfección con un ADNc que codifica el antígeno T 40 grande del virus de simio (Graham, Hawley *et al.* 1993). Estas células exhiben un alto índice de proliferación y comparten varias similitudes fenotípicas con las células parentales de HTR8, incluyendo habilidades invasivas *in vitro*.

Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco®), 1% de L-Glutamina y 1% de PESTA (100U/ml de penicilina/ estreptomycin/ anfotericina). Las células fueron plaqueadas a platos de cultivo de 100 mm, incubadas por dos días en medio suplementado o hasta el 90% de confluencia y cultivadas durante 12 horas en medio libre de proteína, tras lo cual se colocaron los estímulos por el tiempo señalado.

#### Obtención del extracto total de proteínas

Para obtener el proteoma total, las células fueron lisadas empleando buffer RIPA (NaCl 150 mM, Tris-Cl pH 7,4 50 mM, EDTA 5 mM) con Tritón X-100 al 1% (Pierce), con coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, PMSF 50 mM, Leupeptina 0,5 µg/µl, Pepstatina 0,5 µg/µl, Aprotinina 0,5 µg/µl); se incubó por 10 minutos a 4°C, tras lo cual se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos, eliminando los restos celulares y conservando el extracto soluble.

#### Fraccionamiento celular

Se ensayó el fraccionamiento diferencial con detergentes descrito inicialmente por Ramsby y Makowski en 1999 (Walker, 2005), modificando los tiempos de incubación y los inhibidores de proteasas y fosfatasa empleados; y se implementó una serie de lavados tendientes no solo a limpiar el precipitado de cada fracción, sino también a aumentar la obtención de proteínas en la fracción soluble, a recuperar proteínas solubles ocluidas en el precipitado.

La fracción de citoplasma se obtuvo al permeabilizar la célula con el buffer PIPES (Sigma-Aldrich®)/Digitonina al 0,015%, con coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, PMSF 50 mM, Leupeptina 0,5 µg/µl, Pepstatina 0,5 µg/µl, Aprotinina 0,5 µg/µl); se incubó por 10 minutos a 4°C, tras lo cual se centrifugó a 2.000 rpm por 10 minutos. El primer precipitado residual (C-M) que contiene los fantasmas celulares intactos fue lavado tres veces con 50 µl de buffer PIPES con coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa.

Para obtener la fracción de membrana, el precipitado fue solubilizado con el buffer PIPES (Sigma-Aldrich®) / Tritón X-100 (Merck®) al 0,5% con coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, PMSF 50 mM, Leupeptina 0,5 µg/µl, Pepstatina 0,5 µg/µl, Aprotinina 0,5 µg/µl); se incubó por 30 minutos a 4°C, tras lo cual se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos. Este segundo precipitado residual (M-N) que contiene las proteínas nucleares y las fibras del citoesqueleto fue lavado dos veces con 50 µl de buffer PIPES con coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa.

#### Cuantificación de proteínas

Cada extracto proteico obtenido se cuantificó por duplicado usando el kit de Pierce (Pierce®, Thermo scientific), diluyendo la muestra 20 veces y usando como estándar proteico BSA 2,0 – 0,0625 µg/µl. Se midió la absorbancia a 660 nm y se construyó la curva de calibración.

#### Electroforesis SDS-PAGE

Para observar las diferencias en los perfiles electroforéticos de cada fracción obtenida, 30 µg de proteína se separaron mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes, con poliacrilamida al 10%. El gel obtenido se tiñó con Azul de Coomassie R-250 (al 0,1% en 3:6:1 MeOH : H<sub>2</sub>O : Ac. Acético) y fue enjuagado con agua destilada.

#### Western Blot

La presencia o ausencia de proteínas representativas de cada fracción se evaluó mediante Western Blot. 30 µg de proteína de cada fracción celular y lavado se separaron mediante SDS-PAGE al 10% en condiciones desnaturizantes. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa; esta se bloqueó con leche al 5% en TBS (Tris-Base Buffer Saline) a temperatura ambiente por dos horas y media, se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario respectivo a una dilución de 1:1000 con leche al 1% en TBS, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween al 0,01%, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano a una dilución de 1:2000 para el anti-ratón o de 1:10.000 para el anti-conejo con leche al 1% en TBS. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween al 0,01% y se reveló con luminol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una película fotográfica fuji film (Kodak®) por 5 minutos.

Los anticuerpos primarios empleados fueron inmunoglobulinas IgG policlonales de conejo anti-IGF-IR, anti-FAK, anti-ERK 1/2 y anti-Akt (todos de Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e inmunoglobulinas IgG policlonales de ratón anti-p53 (Becton-Dickinson®). Los anticuerpos

secundarios empleados fueron inmunoglobulinas IgG anti-conejo y anti-ratón (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

### **Limpieza de sub-proteomas por precipitación**

Se ensayaron dos métodos de precipitación para efectuar la limpieza de los proteomas, previo a su separación por isoelectroenfoque. En el método Ácido Tricloroacético/Acetona, a la muestra de proteína se agrega ácido tricloroacético frío para una concentración final de 10% v/v y se incuba por 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ , tras lo cual se centrifuga la muestra a 12.000 rpm, por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se lava dos veces con acetona fría y un último lavado con Acetona: Agua 90:10. Finalmente se disuelve en buffer de solubilización.

El método Cloroformo/Metanol se basa en una partición mediante la conformación de un sistema terciario Agua/Metanol:Cloroformo, en el que las proteínas permanecerán precipitadas en la interfase. En este 200  $\mu\text{l}$  de extracto proteico se mezclan con 480  $\mu\text{l}$  de MeOH y 160  $\mu\text{l}$  de  $\text{CHCl}_3$ , y luego con 640  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ; se centrifuga por 5 minutos a 1.400 rpm, tras lo cual se succiona la capa superior y se adiciona 300  $\mu\text{l}$  de MeOH. Se centrifuga por 30 minutos a 14.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , y se deja secar al aire el precipitado de proteína. Este se re suspende en buffer de solubilización.

### **Separación de proteínas por electroforesis en dos dimensiones - 2D-PAGE**

El extracto obtenido se precipitó con cloroformo/metanol para concentrar la muestra y eliminar las sales, y se resuspendió en buffer de resolubilización (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 40mM DTT, con anfolitos 0,5% en gradiente No Lineal 3-10).

Para la primera dimensión (Isoelectroenfoque), se empleó 700  $\mu\text{g}$  de proteína en buffer de resolubilización; se llevó a 300  $\mu\text{l}$  con buffer de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 40 mM DTT, 1% anfolitos 3-10, y trazas de azul de bromofenol) y se usaron tiras secas inmovilizadas (18 cm, pH NL 4-7 de Bio-Rad®). La tira con la muestra se rehidrató de forma pasiva por 2 horas, y de forma activa por 11 horas a 50 V en un focalizador Bio-Rad®. El isoelectroenfoque de las tiras se llevó a cabo a los siguientes gradientes de voltaje: 250 V por 30' (rampa rápida), 1.000 V por 30' (rampa rápida), 1.000 V por 1h (constante), 4.000 V por 45' (rampa rápida), 4.000 V por 1h (constante), y a 8.000 V (rampa rápida) hasta un total de 55 kVh.

Después del isoelectroenfoque, la tira fue incubada por 20 minutos en el primer buffer de equilibrio (5 ml, 6 M urea, 2% SDS, 0,375 M, pH 8.8, Tris-HCl, 20% glicerol, 130 mM

DTT) e incubadas en el segundo buffer conteniendo iodoacetamida 135 mM en vez de DTT.

Para la electroforesis en dos dimensiones, las tiras IPG equilibradas fueron puestas en un gel de poliacrilamida al 12%. La SDS-PAGE fue llevada a cabo a 80 V por 12 horas y luego 90 V por 5 horas, usando una cámara de electroforesis DODECA Bio-Rad®. Como marcador de peso molecular se usó el estándar RPN5800 (GE®). Después de la separación, las proteínas en el gel fueron fijadas con etanol al 30% y ácido fosfórico al 2%; lavadas dos veces con ácido fosfórico al 2%; sensibilizadas en ácido fosfórico al 2%, etanol al 18% y sulfato de amonio al 15%; teñidas con Coomassie coloidal (G-250) al 1%.

## **Resultados**

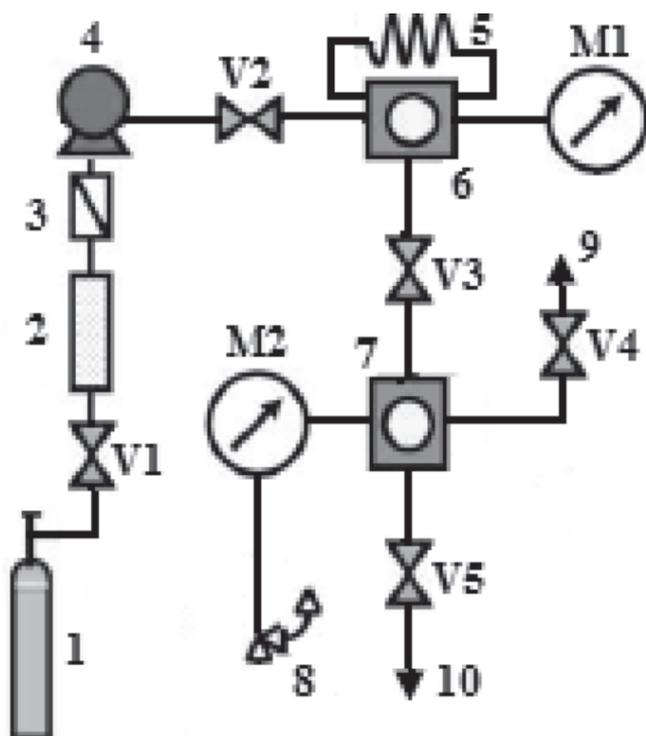
### **Implementación del fraccionamiento celular**

Para llevar a cabo el fraccionamiento celular se utilizó un fraccionamiento diferencial con detergentes usando un protocolo modificado desarrollado inicialmente por Ramsby y Makowski en 1999 (Walker 2005); este método permite obtener sub-proteomas gracias a la extracción secuencial con diferentes detergentes, aislando las proteínas de distintos compartimientos estructural y funcionalmente intactos. Inicialmente se ensayaron diferentes tiempos de incubación con el buffer PIPES/Digitonina (5, 10, 15 y 20 minutos) y se midió la cantidad de proteína obtenida en cada extracto (Figura 1a). Ya que no se encontraron grandes diferencias en la cantidad de proteína de citoplasma obtenida, los análisis posteriores se llevaron a cabo a 5 y 10 minutos de incubación con el buffer PIPES/Digitonina. Si bien, se observó un contenido de proteína muy alto en la solución de lavado del primer precipitado (Lv C-M), el cual corresponde a los fantasmas celulares aún conteniendo la membrana citoplasmática, núcleo y citoesqueleto, y que debe ser lavado para terminar de retirar proteínas de citoplasma; esto implica la necesidad de implementar un mayor número de lavados de este primer precipitado (Figura 1b).

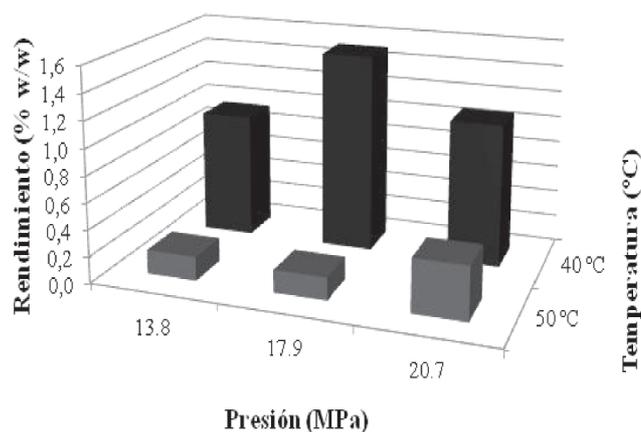
Mediante SDS-PAGE se comprobaron las diferencias en los perfiles electroforéticos de cada fracción, observando un fraccionamiento proteico al comparar cada extracto con el extracto total, con las mayores diferencias entre los perfiles del extracto de citoplasma y de membrana a un tiempo de incubación de 10 minutos (Figura 2).

### **Validación del fraccionamiento celular**

Para evaluar el fraccionamiento celular se llevaron a cabo sendos Western Blot de proteínas representativas de cada



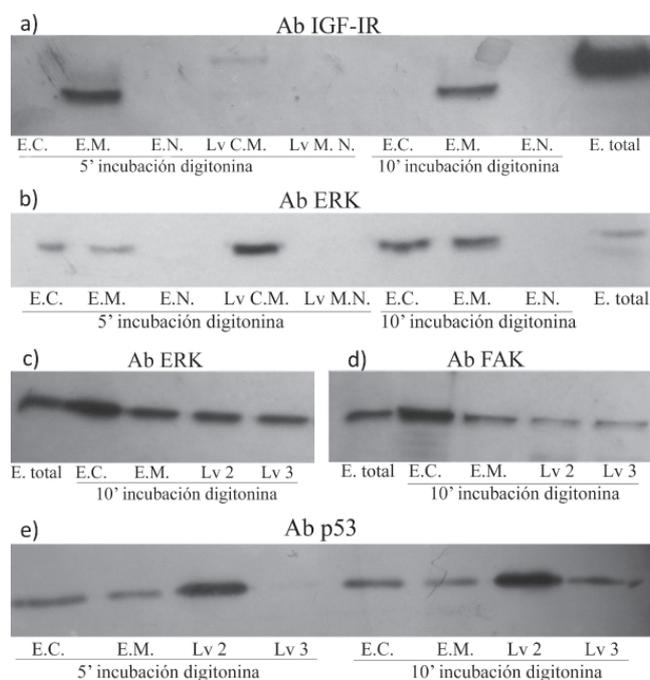
**Figura 1.** Distribución de proteínas en cada fracción obtenida para a) diferentes tiempos de incubación con el buffer PIPES/Digitonina y b) un mayor número de lavados de "pellet", método fraccionamiento diferencial con detergentes, FDD. E.C., extracto de citoplasma; E.M., extracto de membrana; E.N., extracto de núcleo; Lv. C.M., solución de lavado del "pellet" de membrana; Lv M.N., solución de lavado del "pellet" de núcleo.



**Figura 2.** Perfiles electroforéticos para la distribución de la proteína en cada fracción. Diferente tiempo de incubación con el buffer PIPES/Digitonina; E.C., extracto de citoplasma; E.M., extracto de membrana; E.N., extracto de núcleo.

fracción, tales como el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, IGF-IR, para membrana citoplasmática y la quinasa transductora de señal ERK para citoplasma. Los resultados mostraron que bajo las condiciones empleadas, fue posible obtener un extracto enriquecido en proteínas de citoplasma con muy baja contaminación con proteínas de membrana. Se encontró una muy baja contaminación (1,14%) por IGF-IR en el extracto de citoplasma después de diez (10) minutos de incubación con buffer digitonina, el cual no era detectable tras cinco (5) minutos de incubación. La solución de lavado también se encontró libre de proteínas de membrana, lo que indica que se mantiene la integridad celular en este punto (Figura 3a).

Sin embargo, al evaluar la distribución de la quinasa citoplasmática ERK (Figura 3b), se observó la presencia de ésta, tanto en el extracto citoplasmático como en el de membrana, y más abundantemente en la primera solución de lavado del primer precipitado (C-M). Este primer precipitado obtenido, que contiene los fantasmas celulares, se



**Figura 3.** Distribución de proteínas representativas de fracción de membrana citoplasmática y citoplasma detectadas por Western Blot: a) receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, IGF-IR; b) proteína transductora de señal, ERK; c) ERK; d) quinasa de adhesión focal, FAK; e) factor de transcripción, proteína supresora de tumores, p53; E.C., extracto de citoplasma; E.M., extracto de membrana; E.N., extracto de núcleo; Lv. C.M., solución de lavado del "pellet" de membrana; Lv M.N., solución de lavado del "pellet" de núcleo. Lv. 2 y Lv 3, segunda y tercera solución de lavado del "pellet" de membrana, C.M.

sometió a lavados con buffer PIPES para eliminar proteínas de citoplasma residuales al interior de la célula, encontrando un 88,59% de presencia de ERK en el extracto de membrana con respecto al extracto de citoplasma. De tal forma que el extracto de membrana se encontraba enriquecido en proteínas de membrana, pero contaminado con proteínas de citoplasma y era necesario implementar pasos adicionales de lavado del primer precipitado. Al incrementar el número de lavados del primer precipitado (C-M), se observa como disminuye la cantidad de proteína obtenida en la fracción de membrana, así como disminuye la cantidad de proteína presente en cada solución de lavado consecutiva (Figura 1b). No obstante al evaluar la distribución de proteínas citoplasmáticas como ERK (Figura 3c) y FAK (Figura 3d) en las distintas soluciones de lavado obtenidas, así como en la fracción de membrana, se sigue observando la presencia ubicua de estas proteínas. A pesar de lo anterior, el extracto de citoplasma mostró un enriquecimiento en ERK del 208,5% y en FAK del 185,6%, con respecto al extracto total (Figura 3c y 3d).

Si bien, hay que tener en cuenta que estas proteínas, a pesar de ser citoplasmáticas, frecuentemente se anclan a membrana donde llevan a cabo diferentes procesos de señalización: FAK, particularmente, forma complejos con integrinas y otras proteínas de membrana, vinculando también proteínas señalizadoras como ERK, de tal forma que se puede obtener tanto en el extracto de citoplasma como en el de membrana y la presencia de estas en el extracto de membrana no significa plenamente contaminación de este.

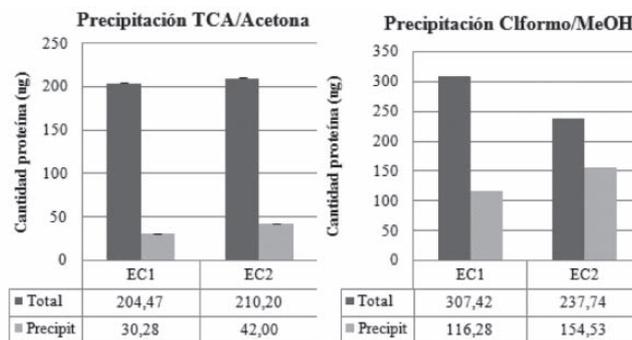
Para descartar que la presencia de proteínas de citoplasma en el extracto de membrana sea debida a la formación de estos complejos focales, se evaluó la presencia de una proteína que se mueve entre citoplasma y núcleo pero nunca llega a las inmediaciones de la membrana plasmática. Esta es el factor de transcripción p53, el cual se encontraba en las 2 fracciones y en los lavados, concluyendo que la fracción de membrana se encuentra contaminada con proteínas de citoplasma, a pesar de los lavados implementados (Figura 3e).

Finalmente, se obtuvo un extracto de citoplasma libre de proteínas de membrana y reproducible, mientras que el extracto de membrana mostró contaminación con proteínas de citoplasma, a pesar de las diferentes estrategias ensayadas.

#### Limpieza de la muestra y verificación de la reproducibilidad tras precipitación

Para la evaluación de proteomas por 2D es necesario el cambio de composición del buffer en el que se encuentran

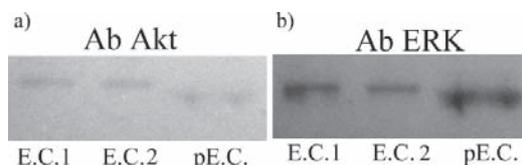
las proteínas y la eliminación de sales y otros compuestos iónicos que puedan interferir con el isoelectroenfoque. Inicialmente se evaluó la precipitación con Ac. Tricloroacético / Acetona, obteniéndose una recuperación muy baja, a diferencia de la precipitación con Cloroformo / Metanol, la cual permite rendimientos y recuperaciones mayores (Figura 4).



**Figura 4.** Evaluación del método de precipitación. Precipitación del extracto de citoplasma con tricloroacético/acetona o con cloroformo/metanol por duplicado. Total, cantidad de proteína citoplasmática original; Precipit, cantidad de proteína obtenida tras precipitación.

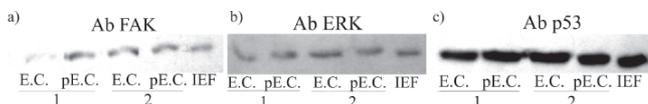
Adicionalmente se evaluó la reproducibilidad del extracto de citoplasma obtenido y se verificó si hay pérdidas selectivas de proteína durante la precipitación; para esto se evaluaron por Western Blot la presencia de diferentes proteínas, como la quinasa transductora de señal, ERK, o la quinasa transductora de señal, Akt, en el extracto de citoplasma o inicial y en el extracto obtenido tras la precipitación con TCA/Acetona.

A pesar del bajo rendimiento registrado para la precipitación con Ac. Tricloroacético / Acetona, la reproducibilidad de la técnica es buena y no se registraron pérdidas selectivas de proteína durante la precipitación (Figura 5). De igual forma, para el caso del cloroformo se obtuvo una buena reproducibilidad tanto en los extractos de citoplasma



**Figura 5.** Evaluación de la reproducibilidad del extracto de citoplasma obtenido y de la precipitación con TCA/Acetona, mediante Western Blot. a) Ab 1 contra Akt, b) Ab 1 contra ERK. E.C., extracto de citoplasma; pE.C., extracto de citoplasma obtenido tras precipitación.

como con los precipitados obtenidos, sin presentarse pérdidas selectivas de proteína, respecto a las proteínas evaluadas (Figura 6). De tal forma que es posible obtener extractos reproducibles, incluso a nivel del precipitado y sin pérdidas selectivas de material, aspecto muy importante a la hora de trabajar en proteómica.



**Figura 6.** Evaluación de la reproducibilidad del extracto de citoplasma obtenido y de la precipitación con Cloroformo/Metanol, mediante Western Blot. a) Ab 1 contra FAK, b) Ab 1 contra ERK, c) Ab 1 contra p53. E.C., extracto de citoplasma; p.E.C., extracto de citoplasma obtenido tras precipitación; IEF, extracto total obtenido con buffer de isoelectroenfoque.

### Obtención de geles bidimensionales

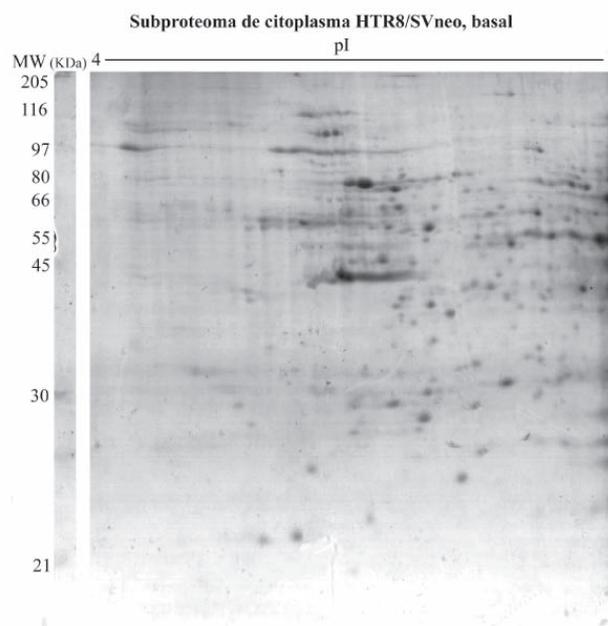
Para confirmar la limpieza de la muestra y su fraccionamiento, se analizó mediante electroforesis bidimensional el sub-proteoma de citoplasma obtenido con el fraccionamiento diferencial con detergentes, y limpiado y concentrado por precipitación con cloroformo/metanol. Se observó una buena separación y resolución de los “spots” tanto en la primera dimensión como en la segunda, así como una adecuada distribución de la muestra dentro del gel.

Al comparar el sub-proteoma de citoplasma obtenido con un perfil proteico proveniente del proteoma total (ver Figura 8), en general se observa un menor número de “spots” en el sub-proteoma, debido al fraccionamiento, siendo las proteínas de citoplasma el 46% del proteoma total; pero también se visualizan 85 “spots” que no tienen correspondencia con el proteoma total.

Los “spots” presentes en el sub-proteoma de citoplasma y ausentes en el proteoma total demuestran la importancia del fraccionamiento, ya que este, además de simplificar el análisis al disminuir la complejidad del extracto a analizar, permite mejorar la visualización de “spots” al enriquecerlos, que de otra forma quedarían ocultos debido al rango dinámico tan amplio de las proteínas.

### Discusión

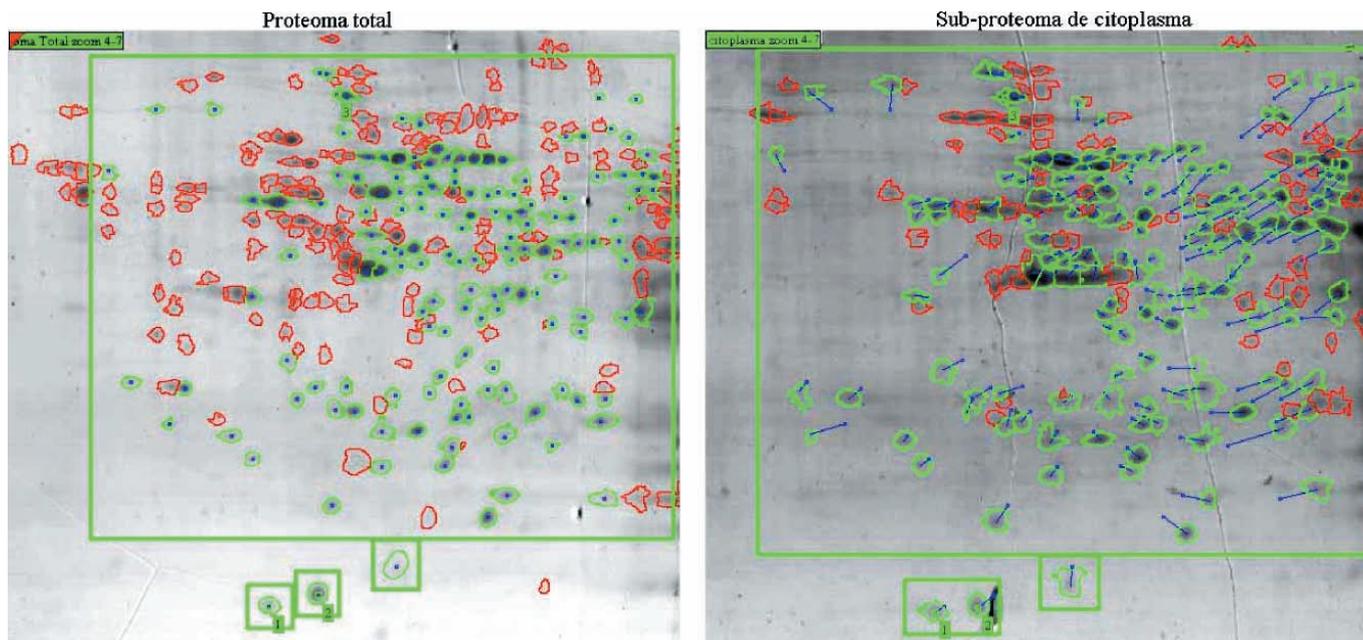
En general, cualquier manipulación aplicada a una mezcla compleja de proteínas va a conducir a algunas pérdidas inespecíficas de proteínas, como las que se registraron en la precipitación durante los pasos de preparación de la muestra. Este hecho sugiere que, cualquier pre-fracciona-



**Figura 7.** Sub-proteoma de citoplasma basal de la línea celular de trofoblasto HTR8/SVneo. El extracto de citoplasma fue obtenido por fraccionamiento diferencial con detergentes y precipitado con Cloroformo/Metanol. Una alícuota de proteína (700 ug) fue solubilizada en Buffer IEF Urea/Tiourea/DTT y separada por 2DE usando tiras IEF de 18 cm en gradiente lineal de pH 4-7 y SDS-PAGE al 12%. Los “spots” de proteína fueron visualizados por tinción con Coomassie coloidal. El marcador de peso empleado fue RPN5800 (GE®) para HTR8/SVneo.

miento de una muestra para análisis proteómico debe ser evitada. Sin embargo, la experiencia práctica reportada en diversos artículos y libros (Reiner Westermeier, 2008), demuestra que a pesar de lo anterior no existe ningún proceso que ofrezca un cubrimiento completo de un proteoma total y solo la pequeña combinación de técnicas y métodos permite resultados superiores. Por lo tanto, la afirmación de que adquirir un proteoma total con solo un procedimiento es obsoleta, y no solo es viable, sino necesario realizar un fraccionamiento orientado a enriquecer las proteínas de interés, en este caso, proteínas de citoplasma y membrana. Este fraccionamiento celular es importante ya que gracias a él se logra reducir la complejidad de un proteoma, mejorando la separación y evitando la superposición de proteínas abundantes, y en consecuencia incrementando considerablemente el número de identificaciones.

Por otro lado, el trabajo en proteómica requiere de alta reproducibilidad experimental que permita obtener datos biológicamente significativos y reproducibles. No obstan-



**Figura 8.** Geles 2D del proteoma total y del sub-proteoma de citoplasma basal (RPMI) para la línea celular de trofoblasto, HTR8/SVneo. Una alícuota de proteína (1,0 mg) fue solubilizada en Buffer IEF Urea/Tiourea/DTT y separada por 2DE usando tiras IEF de 18 cm en gradiente lineal de pH 4-7 y SDS-PAGE al 12%. Los “spots” de proteína fueron visualizados por tinción con Coomassie coloidal. En círculos verdes: “spots” equivalentes; en círculos rojos: “spots” sin correspondencia; en verde se muestran los 3 marcadores empleados durante el apareamiento, y en azul el campo vectorial generado por el apareamiento. Imagen generada por el programa ImageMaster 2D Platinum 7.02.

te, para llevar a cabo esto es necesario implementar y validar las técnicas y métodos a emplear, asegurando la obtención de un sub-proteoma de citoplasma libre de proteínas de membrana y reproducible, para así poder determinar con certeza la ubicación celular de las proteínas a estudiar durante un análisis proteómico cualitativo, que pueda conducir a análisis proteómicos espacio-temporales.

Es posible determinar parcialmente la reproducibilidad de la técnica a nivel de los proteomas, obteniendo réplicas biológicas y técnicas; no obstante esto no permite determinar si hay pérdida selectiva de proteína durante la precipitación del extracto obtenido. En el presente caso, esto se logró al realizar Western Blot empleando anticuerpos específicos para diferentes proteínas, en los extractos de citoplasma antes y después de precipitar, siendo los geles de electroforesis 1-D y la técnica de Western Blot particularmente útiles para realizar una comparación preliminar de reproducibilidad de replicados de extractos.

Finalmente, el análisis de proteomas totales puede ser una labor ardua, por lo que es ideal realizar un fraccionamiento celular que permita disminuir la complejidad del extracto a analizar. Debido a que la línea de trofoblasto,

HTR8/SVneo es un modelo interesante para comprender la patología del cáncer, el estudio de sus proteomas de membrana y de citoplasma es de gran interés.

En conclusión, la técnica de fraccionamiento con detergentes y precipitación con Cloroformo / Metanol empleada resultó adecuada para la obtención de un sub-proteoma de citoplasma de la línea celular de trofoblasto, HTR8/SVneo, con una reproducibilidad y recuperación adecuadas para su análisis por electroforesis bidimensional.

### Financiación

Este trabajo fue financiado por la Dirección de Investigación de la sede Bogotá DIB, Universidad Nacional de Colombia (Proyectos Códigos: 10901 y 7193) y por Colciencias (Proyecto Código 110145221052).

### Referencias bibliográficas

- Dowling, P. M., P. Dowd, A. Henry, M. Glynn, S. Clynes, M. 2007. “Proteomic analysis of isolated membrane fractions from superinvasive cancer cells.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1774:93-101.

- Everberg, H., T. Leiding, et al.** 2006. "Efficient and non-denaturing membrane solubilization combined with enrichment of membrane protein complexes by detergent/polymer aqueous two-phase partitioning for proteome analysis." *Journal of Chromatography A* **1122**(1-2): 35-46.
- Ferretti, C., L. Bruni, et al.** (2007). "Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts." *Hum Reprod Update* **13**(2):121-141.
- Foster, L. J., et al.** 2005. "Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation". *Stem Cells* **23**(9):1367-1377.
- Gonnet, F., et al.** 2003. "MALDI/MS peptide mass fingerprinting for proteome analysis: identification of hydrophobic proteins attached to eucaryote keratinocyte cytoplasmic membrane using different matrices in concert". *Proteome Science* **1**(1):2.
- Graham, C. H., T. S. Hawley, et al.** 1993. "Establishment and Characterization of First Trimester Human Trophoblast Cells with Extended Lifespan". *Experimental Cell Research* **206**(2):204-211.
- Jethwaney, D., et al.** (2007). "Proteomic analysis of plasma membrane and secretory vesicles from human neutrophils". *Proteome Science* **5**(1):12.
- Liang, X., et al.** 2006. "Quantification of membrane and membrane-bound proteins in normal and malignant breast cancer cells isolated from the same patient with primary breast carcinoma." *J. Proteome Res* **5**(10):2632-2641.
- McCarthy, F. M., S. C. Burgess, et al.** 2005. "Differential Detergent Fractionation for Non-electrophoretic Eukaryote Cell Proteomics." *Journal of Proteome Research* **4**(2):316-324.
- Payraastre, B., M. Plantavid, et al.** 1988. "Characterization of plasma membranes from A431 cells, isolated by self-generating Percoll gradient: a rapid isolation procedure to obtain plasma membranes with functional epidermal growth factor receptors". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **939**(2):355-365.
- Reiner Westermeier, T. N., Hans-Rudolf Höpker** 2008. *Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design*. Weinheim, Wiley-VCH.
- Roobol-Bóza, M., V. Dolby, et al.** 2004. "Membrane protein isolation by in situ solubilization, partitioning and affinity adsorption in aqueous two-phase systems: Purification of the human type 1 11[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase." *Journal of Chromatography A* **1043**(2):217-223.
- Selinsky, B. S. (Ed.)** 2003. *Membrane Protein Protocols: Expression, Purification, and Characterization*. Methods in Molecular Biology, Humana Press.
- Vertommen, A., B. Panis, et al.** 2011. "Challenges and solutions for the identification of membrane proteins in non-model plants." *Journal of Proteomics* **74**(8):1165-1181.
- Walker, J. M., (Ed.)** 2005. *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, New Jersey, Humana Press Inc.
- Zhang, L., et al.** 2008. "Dataset of the plasma membrane proteome of nasopharyngeal carcinoma cell line HNE1 for uncovering protein function." *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **40**(1):55-70.

Recibido: junio 20 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.



# ANTI-TUMOR EFFECTS OF SIMVASTATIN ON UMR-106 OSTEOSARCOMA CELL LINE

María Claudia Sandoval-Usme<sup>1</sup>, Natalia Ordóñez<sup>1</sup>, Adriana Umaña-Pérez<sup>1</sup>,  
Leandro Fernández-Pérez<sup>2</sup>, Myriam Sánchez-Gómez<sup>1\*</sup>

## Abstract

Sandoval-Usme, M. C., N. Ordóñez, A. Umaña Pérez, L. Fernández-Pérez, M. Sánchez-Gómez: Anti-tumor effects of simvastatin on UMR 106 osteosarcoma cell line. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **35** (136): 287-294, 2011. ISSN 0370-3908.

Statins have been widely used for the treatment of hypercholesterolemia and other cardiovascular diseases. Recently, statins have been studied for their apoptotic effects which make them relevant for cancer prevention and treatment; however, their exact mechanisms of action are still unclear. In this study, we used malignant UMR-106 osteosarcoma cells and normal HTR8/SVneo extravillous trophoblast cells, and found that simvastatin decreases cell viability, in a dose and time-dependent manner in both cell types. In addition, 10  $\mu$ M simvastatin was able to induce apoptosis in trophoblast cells as evaluated by FACS analysis. Finally, proteomic analysis of protein expression suggests a specific regulatory mechanism that could explain some of the anticancer effects of this statin.

**Key words:** cancer, growth inhibition, statins, simvastatin, apoptosis.

## Resumen

Las estatinas se han usado ampliamente en el tratamiento de la hipercolesterolemia y otras enfermedades cardiovasculares. Recientemente se han estudiado sus efectos apoptóticos lo que las hace relevantes en la prevención y tratamiento del cáncer, aunque sus mecanismos de acción se desconocen. En este estudio empleamos células malignas de osteosarcoma UMR-106 y células normales de trofoblasto extravelloso HTR8/SVneo y encontramos que la simvastatina, reduce la viabilidad celular de manera dependiente del tiempo y la dosis, en ambos tipos celulares. Además, mediante FACS se demostró la inducción de apoptosis por simvastatina 10  $\mu$ M en células trofoblásticas. Por último, el análisis proteómico sugiere un mecanismo regulatorio específico que podría ayudar a explicar los efectos anticancerosos de esta estatina.

**Palabras clave:** cáncer, inhibición crecimiento, estatinas, simvastatina.

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Hormonas, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

<sup>2</sup> Department of Clinical Sciences, Molecular and Translational Endocrinology Group, University of Las Palmas de Gran Canaria – Cancer Research Institute of The Canary Islands (ICIC), Spain.

\* Correspondencia: email: mysanchezd@unal.edu.co

## Introduction

Statins have been widely used for the treatment of hypercholesterolemia and other cardiovascular diseases. In the past few years, interest has grown around these drugs as an alternative for cancer treatment, as a response to the increasing amount of information about clinical and molecular evidence that statins in fact, can attack cancer cells, in a cell type-specific manner (Gauthaman, *et al.* 2009, Mueck, *et al.* 2003, Wong, *et al.* 2002). Statins decrease cholesterol synthesis by inhibiting the rate-limiting enzyme, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase, involved in the mevalonate and cholesterol synthesis (Riganti, *et al.* 2008). The mechanism by which statins exert their effects on cells is not well known, although most biological effects have been widely documented (Aberg, *et al.* 2008, Koyuturk, *et al.* 2004, 2007). Considering the growing information obtained on statins, research is necessary to understand the targets of this drug and the potential role as adjuvant in therapy. In a previous study it was found that simvastatin, a lipophilic statin, has wide effects on the osteoblast-like osteosarcoma cell line UMR-106 (Cabrera-Benitez, 2008). Osteosarcoma is the second cancer-related cause of death among children and young adults resulting in tumors on tibia, femur and humerus (Heare, *et al.* 2009). The aim of the present study was to investigate the effects of simvastatin on cell viability and apoptosis, using two different cell lines: osteosarcoma cell line UMR-106 and trophoblast cell line HTR8/SVneo, the later of interest considering its high proliferation and invasion levels similar to cancer cells. A preliminary analysis of the protein expression associated with simvastatin treatment in osteosarcoma cells was examined using a proteomic approach.

## Materials and methods

### Cell Culture

UMR-106, rat osteosarcoma cells and HTR8/SVneo, human trophoblast cells, were grown in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 Units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% carbon dioxide. For simvastatin treatment, cell media was refreshed and simvastatin or vehicle was added in the indicated concentration.

### Cell Viability Assay

Cell viability was assayed by measuring the mitochondrial reduction of the tetrazolium salt ([3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], MTT)

(Carmichael, *et al.* 1987). Cells were seeded in 96-well plates in medium supplemented with 10% FBS at a cell density of 20000 cells/well. Twenty-four hours later, simvastatin was added to the medium at the indicated concentrations (0.03 to 10 µM) or vehicle (0.01% ethanol) and cells were cultured for the indicated times. MTT (0.5 mg/ml) was added to each well for the last four hours and incubated at 37°C. The medium was then discarded and the formazan precipitate was solubilized by addition of 20% SDS in 0.02N HCl for 12-16 hours. The optical density was measured at 595 nm with an ELX 800 Universal Microplate reader (Bio-TEK Instruments, INC.). Data was expressed as percent growth above the level in controls and the results in figures were plotted as means ± SEM of each test point from 3 separate experiments. IC<sub>50</sub> was determined from a plot when fitted to a sigmoidal dose-response curve.

### Flow cytometry

Detection and quantification of apoptosis was done by flow cytometry, double staining with Annexin V-FITC (AbD Serotec) and Propidium Iodide (PI). HTR8/SVneo cells were plated in 60 mm dishes to confluence, FBS deprived for 8 hours and simvastatin 1 or 10 µM was added for 2 or 48 hours. As a positive control of apoptosis cells were treated with 3% formaldehyde for 30 minutes. Cells were trypsinized for 5 minutes and collected by centrifugation. The pellet was washed with 1% Bovine Serum Albumin (BSA). Afterwards, 106 cells were labeled with 1 µg Annexin V-FITC for 10 minutes and 1 µg/mL PI, using Annexin V FITC kit (AbD Serotec, Oxford, UK), according to manufacturer's instructions. Flow cytometry analysis was performed on a FACScan using CellQuest Pro software (BD Biosciences, Mountain View, CA) analyzing 10000 events for each treatment.

### Preparation of whole cell extract

UMR-106 cells were grown to confluence in 100 mm cell culture dishes and incubated as mentioned above. Cells were treated with 10 µM simvastatin or vehicle for 8 hours in fresh DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were rinsed with ice-cold PBS, scrapped with lysis buffer (RIPA buffer, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 µg/mL aprotinin, 2 µg/mL leupeptin, 2 µg/mL pepstatin) and incubated on ice for 15 min. Lysates were centrifuged and supernatants were used as whole cell extract. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford, 1976).

### Phenol extraction

Prior to 2D electrophoresis, proteins were extracted from whole cell extracts using pH 8.0 Tris-HCl-saturated phenol,

in order to remove interferences such as salts, lipids and nucleic acids as reported previously (Arévalo-Ferro, 2004). Briefly, 1mL aliquots from the protein extracts were mixed by vortexing with 1mL phenol and incubated for 10 min at 70°C. The sample was cooled on ice for 5 min and the phases were separated by centrifugation at 5000 rpm for 10 min. at 4°C. The aqueous phase was discarded and 1mL of distilled water was added. This procedure was repeated once and proteins were precipitated with 1 mL of ice-cold acetone. The pellet was recovered by centrifugation at 15000 rpm for 20 min 4°C and washed with 1 mL of acetone, centrifuging for 10 min at 4°C 15000 rpm. After the pellet was dried, proteins were resuspended in 300  $\mu$ L of solubilization buffer (8M Urea, 2% CHAPS, 0.2% Carrier ampholytes pH 3-10, 2.8 mg/mL 1,4-dithiothreitol (DTT), and a trace of bromophenol blue).

### Two-dimensional Electrophoresis(2-DE)

Two-dimensional electrophoresis was carried out according to the manufacturer's instructions. Briefly, protein samples were resuspended in solubilization buffer, as described above and 18 cm pH 3-10 nonlinear strips were used (Bio-Rad®). Strips were passively rehydrated with sample containing 500  $\mu$ g protein for 2 hours, followed by active rehydration at 50 V for 11 hours performed in the Protean IEF System (Bio-Rad®, USA) First-dimension isoelectric focusing (IEF) was carried out increasing linearly from 250V to 8000 V until reaching 55kVh. The IPG strip was then equilibrated in 6 M urea, 30% w/v glycerol, 2% w/v SDS, 0.05 M Tris-HCl pH 8.8, 2% w/v DTT and then with 2.5% w/v iodoacetamide. Second dimension, SDS-PAGE was carried out on a 12% polyacrylamide gel in the Bio-Rad vertical system (230  $\times$  200  $\times$  1.5 mm; Gibco®, USA) at a constant voltage of 80V for 12 hours and 90 V for 5 hours. Gels were visualized using Colloidal Coomassie staining and then analyzed qualitatively and quantitatively by PDQuest Soft-

ware (Bio-Rad®). Spot intensities were analyzed using pixel units and compared between the two gels.

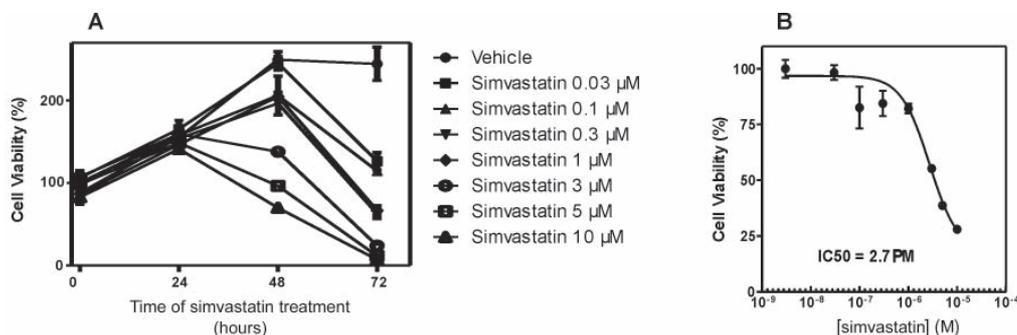
## Results

### Simvastatin reduces cell viability of osteosarcoma and trophoblast cells

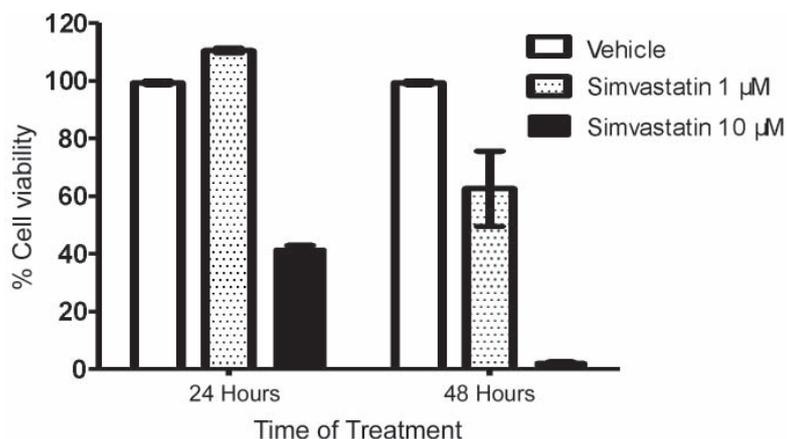
First, we examined the effect of simvastatin on UMR-106 cell viability by MTT assay. The viable cell number of UMR-106 was decreased in a dose and time dependent manner (Fig. 1A). We found that doses of simvastatin higher than 1  $\mu$ M significantly reduced cell viability up to 72% when cells were treated with 10  $\mu$ M simvastatin compared to values of control cells, after 48 h of exposure to the drug. IC<sub>50</sub> value was measured to be 2.7  $\mu$ M simvastatin, concentration needed to reduce growth of osteosarcoma cells by 50%, (Fig 1B). To compare the effect of the statin on the growth of a normal cell line, we used the trophoblast HTR8/SVneo cell line. Cells were not affected by 1 $\mu$ M simvastatin at 24 hours, however, doses as high as 10  $\mu$ M decreased cell viability by 60% at 24 h and had a profound cytotoxic effect at 48 h, compared to control cells (Fig 2).

### Apoptosis in HTR8 cells is increased by 10 $\mu$ M simvastatin

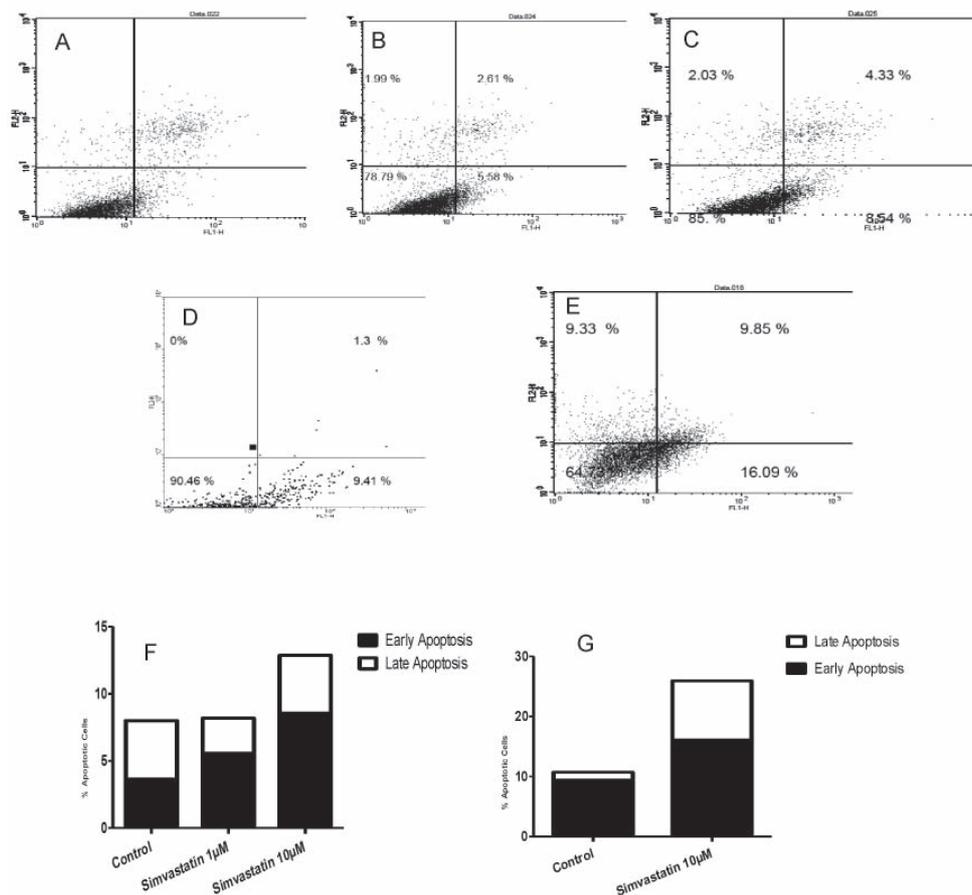
We determined whether simvastatin could induce apoptosis in HTR8/SVneo cells. As shown in Fig. 3, simvastatin induced a dose-dependent early apoptotic effect after 2 hours of treatment. The effect was more notable with 10  $\mu$ M simvastatin as observed with the increase in apoptotic cells from 8.8% to 12.8% (Fig 3a). After 48 hours, the effect was intensified and we observed a raise in apoptotic cells from 10.7% to 25.9% compared to cells treated with vehicle. Both early and late apoptotic cells were increased after simvastatin treatment, indicating that



**Figure 1.** Effect of simvastatin on UMR-106 cells. A) Cells were incubated in medium containing various concentrations of simvastatin and number of viable cells was measured by MTT assay. B) IC<sub>50</sub> concentration for simvastatin. Values are expressed as percent to controls  $\pm$  SEM from 3 separate experiments.



**Figure 2.** Effect of simvastatin on HTR8/SVneo cell proliferation. Cells were incubated in medium containing simvastatin (1 μM or 10 μM) and cell proliferation was measured by MTT assay at 24 h and 48 h. Values are expressed as mean ± SEM for three replicates.



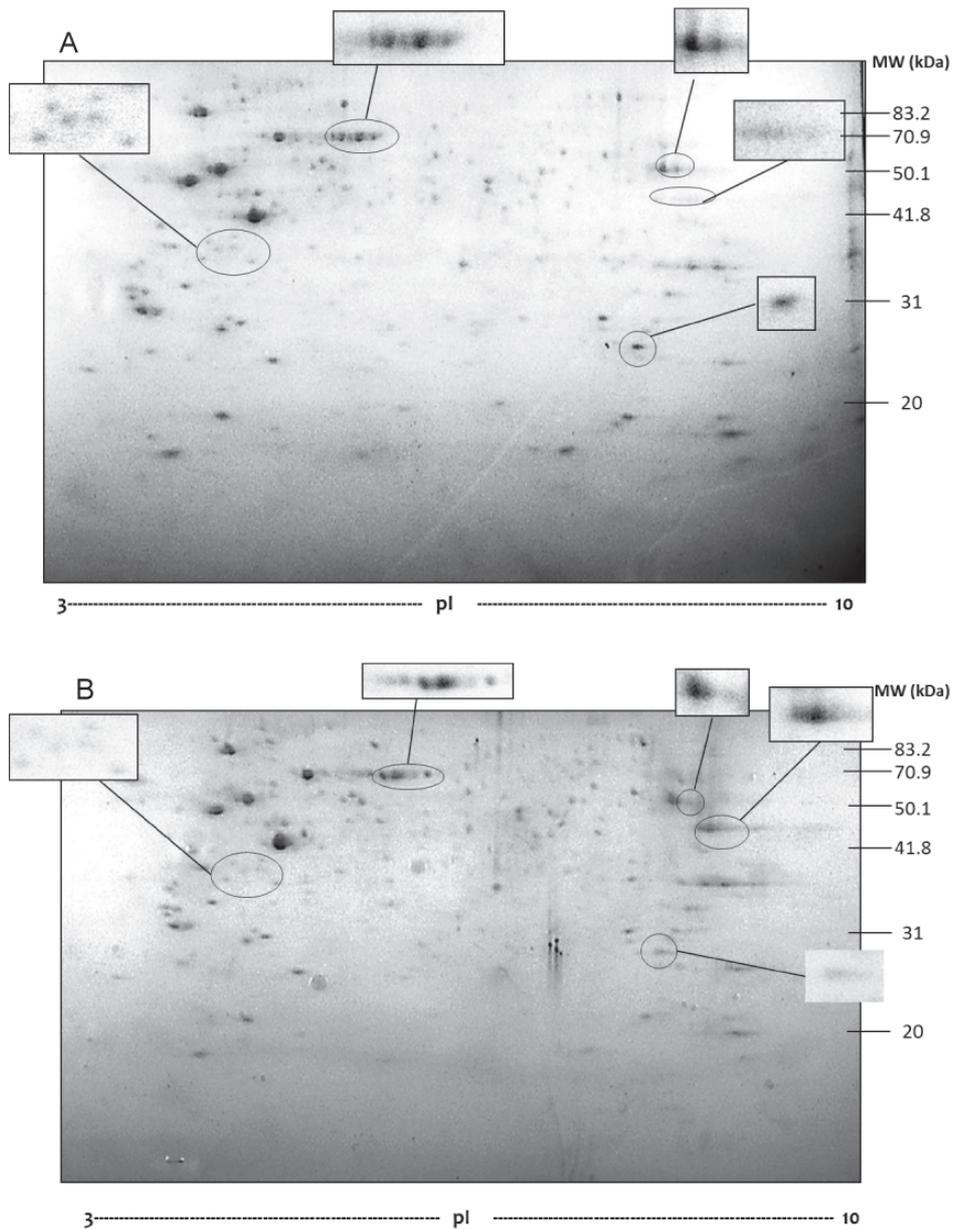
**Figure 3.** Effect of simvastatin on apoptosis. Flow cytometry analysis on HTR8/SVneo cells. Cells were treated with vehicle (A), simvastatin 1 μM (B) and simvastatin 10 μM (C) for 2 hours or vehicle (D), simvastatin 10 μM (E) for 48 hours. Cells were quantified by using dual staining of Annexin-V-FITC and propidium iodide. Results shown in column charts as percentage of apoptotic cells after 2 hours of treatment (F) and 48 hours of treatment (G).

this statin can influence cell viability and proliferation in trophoblast cells by the induction of apoptosis.

**Proteomic profile of UMR-106 cells is influenced by simvastatin treatment**

The molecular mechanisms by which statins exert their effects on cells are poorly documented. We investigated the changes in global protein expression by two-dimensional electrophoresis (2-DE) of cells exposed to 10µM

simvastatin for 48 h, in comparison with cells treated with vehicle. The 2-DE gel images obtained are shown in Fig 4A and B and some of the spots that were found to be differentially expressed between the two conditions are highlighted. This illustrates some of the most noticeable differences in expression comparing both gels. Gel images were analyzed using PD Quest Software and results revealed that 211 protein spots were found in cells treated with simvastatin, compared to 219 protein spots found in



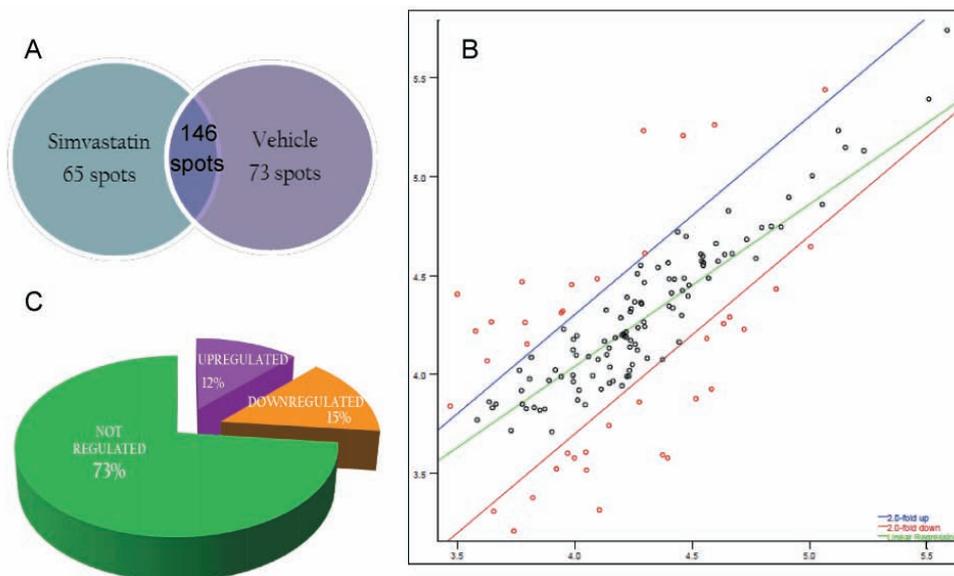
**Figure 4.** 2D gels of UMR-106 osteosarcoma cells treated with vehicle (A) or simvastatin 10 µM (B). Selected regions are zoomed in to show significant differences between the two treatments.

control gel. Through densitometry analysis we were able to determine that a total of 146 protein spots were found to be common to both conditions, whereas 65 spots were only expressed in cells under statin treatment and 73 spots were exclusively found in control cells (Fig. 5A). A scatter plot illustrates the regulation profile of matched proteins in both gels, where 18 spots (12%) were at least 2 fold up-regulated and 21 spots (15%) were at least 2 fold down-regulated by simvastatin, compared to the control cells (Fig. 5B). To summarize, Fig 5C shows the distribution of matched proteins.

## Discussion

Simvastatin is a lipophilic statin, highly used in the treatment of cardiovascular diseases. Like other statins, inhibits the rate-limiting step of cholesterol biosynthesis, the conversion of 3-hydroxy-3-methylglutarylCoA (HMG-CoA) to L- mevalonic acid, through binding to HMG-CoA reductase's active site. In addition to a decrease in hepatic cholesterol synthesis, statins could also inhibit the synthesis of important isoprenoid intermediates, such as dolychol phosphate, farnesylpyrophosphate (FPP) and geranylgeranylpyrophosphate (GGPP). These intermediates have a role in N-linked glycosylation and as lipid attachments for membrane proteins involved in signal transduction (Casey, 1992, Sinensky, 2000).

Several studies worldwide have shown the effect of simvastatin and other statins in cell viability, migration and invasion levels (Hoque, *et al.* 2008, Kidera, *et al.* 2010, Koyuturk, *et al.* 2004, Wong, *et al.* 2002). Some studies have shown a decreased risk of developing cancer in general in patients that regularly take statins as hypercholesterolemia therapy (Demierre, *et al.* 2005, Stamm, *et al.* 2005). However, the exact mechanisms of their anticancer action are still unclear. In this study, we found that simvastatin decreases cell viability, in two different cell types, in a dose and time-dependent manner. UMR-106 cells, derived from rat osteosarcoma, were significantly affected by simvastatin, as deduced by the marked reduction in cell viability and the relatively low  $IC_{50}$  value for the drug. The  $IC_{50}$  concentration, which is indicative of the levels of cytotoxicity of simvastatin, varies according to the cell type in a wide range (Guerrero, *et al.* 2010). The  $IC_{50}$  value of 2.7 $\mu$ M we found for osteosarcoma cells is lower than those reported for simvastatin and other statins structures (Gronich, *et al.* 2004, Guerrero, *et al.* 2010, Kang, *et al.* 2005, Koyuturk, *et al.* 2007). In a review by Graaf *et al.* (2004) is stated that a mutation on p53 protein might increase the  $IC_{50}$  value found in several cancer cell lines for statins and farnesyl transferase inhibitors. Therefore, UMR-106 osteosarcoma cell line is particularly sensitive to simvastatin compared with other cancer cells. To our knowledge, no p53 mutations have been reported



**Figure 5.** Proteomic analysis of protein spots found on 2DE gels. A. The amount of spots found exclusively or commonly in gels of cells treated with either vehicle or simvastatin 10  $\mu$ M. B. Scatter plot of protein spots found in both gels. Linear regression of an average in intensity between the spots is shown in green Red and blue lines show protein spots downregulated and upregulated, respectively. C. Proteins commonly expressed in both gels are distributed according to their expression level.

on this osteosarcoma cell line so far and it was previously reported that the simvastatin-induced cell cycle arrest is p53 independent (**Cabrera-Benitez**, 2008).

Inhibitory effects of statins have also been examined in normal tissues. Although the placenta is considered a normal tissue, its constitutive trophoblastic cells are characterized by high rates of proliferation and invasion, similar to the behavior of cancer cells. These abilities make them ideal for monitoring molecular changes taking place during the acquisition of a malignant/invasive phenotype. In previous studies, placental tissues treated with simvastatin revealed similar results as those obtained with malignant tissues. When explants are treated with doses of the statin up to 10  $\mu$ M, a significant decrease in cell proliferation and an increase in apoptosis events were shown (**Kenis, et al.** 2005). In the present study, we used an immortalized extravillous cell line, HTR-8/SVneo, derived from trophoblast cells of the first trimester of pregnancy, where growth plays a critical role in the development of the fetus and could demonstrate the growth inhibition and pro-apoptotic effects of simvastatin as well.

Statins effects on cell signaling are not completely understood, but it seems to be a pleiotropic effect, and it does not only compromise a particular pathway, but rather a whole network involving the cholesterol biosynthesis and its precursors. Cholesterol has been found to have an essential part in the growth of all eukaryotic cells, especially in rapidly proliferating cells, which usually have high levels of cholesterol synthesis and HMG-CoA reductase (**Siperstein**, 1984). Mevalonate biosynthesis catalyzed by HMG-CoA reductase is the starting step for a chain reaction that involves the biosynthesis of isoprenes, which are implicated in DNA synthesis initiation (**Larsson**, 1996). Thus, decreasing HMG-CoA reductase activity can also regulate cell growth and proliferation, as proven with our results. Nevertheless, the role of statins as inhibitors of farnesylated and geranylgeranylated proteins cannot be discarded. Statin treatment also inhibits isoprene synthesis, which directly affects posttranslational modifications necessary for proteins such as Rho, Ras, Rac and Cdc42, to anchor to the membrane, and all the conformational changes needed for the signaling pathway to start. Proteins from the Ras superfamily are involved in several biological processes including proliferation, migration and invasion of both cancerous and non-cancerous cells, therefore, a downregulation on either of these pathways might also lead to decreasing proliferation and apoptosis. Further studies carried out in our research group point towards the participation of other signaling pathways also involved in cell malignization like JAK/STAT pathway and its

negative regulators, SOCS proteins. We found SOCS-3 and CIS mRNA levels to be upregulated with simvastatin treatment (**Sandoval-Usme, et al.** 2010). Additional studies are required to investigate which are the molecular effects of statins in signaling pathways and how SOCS proteins and JAK/STAT pathway might be implicated in simvastatin effects on osteosarcoma cells.

Finally, in order to get insight into the potential targets of simvastatin action, we examined the global changes in protein profile of statin treated cells. Using a proteomic approach we found that simvastatin exposure results in changes in the cellular protein profile, regulating the level of expression of already expressed proteins and inducing the expression of new ones. All this lead us to think that simvastatin effects on protein expression are very specific, probably depending more likely on those exclusively expressed proteins, than on the regulation of those preexisting proteins. However, regulated proteins cannot be discarded, considering that changes in expression were significant and they might also represent important changes in signaling pathways, which would allow us to further clarify the effects of statin on cancerous and non-cancerous cells. Protein identification was out of the scope of this paper, but future mass spectrometry studies can give us a broader vision of the differences in protein signaling and also provide us with other protein targets.

## Conclusions

Simvastatin induces apoptosis and inhibits proliferation in a time and dose-dependent manner in normal and cancerous cells. Proteomic analysis of protein expression gives support to a specific regulatory mechanism that could explain some of the anticancer effects of this statin. Further research is needed to identify the proteins responsible for this action.

## Acknowledgments

This work has been supported by grants from the Dirección de Investigación Bogotá, DIB, Universidad Nacional de Colombia (Projects: 10878 and 12243) and Colciencias (Project: 110145221052).

HTR8/Svneo cell line was kindly donated by Dr. Angela Cadavid from Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

## References

- Aberg, M., Wickstrom, M. and Siegbahn, A.** 2008. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells in a NF $\kappa$ B-dependent manner and abolishes the anti-apoptotic signaling of TF/FVIIa and TF/FVIIa/FXa, *Thromb Res* 122(2):191-202.

- Arévalo-Ferro, C.** 2004. Proteomics View Of Quorum-Sensing Regulated and Surface Induced Genes in Representative Pseudomonas and Burkholderia Species., 128, PhD, Institute of Microbiology of Technischen München, Germany.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72:248-254.
- Cabrera-Benitez, N. E.** 2008. Papel de los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (estatinas) en las líneas celulares de osteosarcoma. Estudio In vitro., 141, PhD, Departamento de Ciencias Clínicas, Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, Spain.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B.** 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res* 47(4):936-942.
- Casey, P. J.** 1992. Biochemistry of protein prenylation, *J Lipid Res* 33(12):1731-1740.
- Demierre, M. F., Higgins, P. D., Gruber, S. B., Hawk, E. and Lippman, S. M.** 2005. Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 5(12):930-942.
- Gauthaman, K., Manasi, N. and Bongso, A.** 2009. Statins inhibit the growth of variant human embryonic stem cells and cancer cells in vitro but not normal human embryonic stem cells. *Br J Pharmacol* 157(6):962-973.
- Gronich, N., Drucker, L., Shapiro, H., Radnay, J., Yarkoni, S. and Lishner, M.**, 2004. Simvastatin induces death of multiple myeloma cell lines, *J Investig Med* 52(5):335-344.
- Guerrero, M., Di Giulio, C. and De Sanctis, J. B.** 2010. Las estatinas afectan la viabilidad de líneas celulares de leucemia y linfoma humanas in vitro, *Revista de la Facultad de Medicina* 33(1):11-14.
- Heare, T., Hensley, M. A. and Dell'Orfano, S.** 2009. Bone tumors: osteosarcoma and Ewing's sarcoma, *Curr Opin Pediatr* 21(3):365-372.
- Hoque, A., Chen, H. and Xu, X. C.** 2008. Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(1):88-94.
- Kang, W. K., Lee, I., Ko, U. and Park, C.** 2005. Differential effects of RhoA signaling on anticancer agent-induced cell death, *Oncol Rep* 13(2):299-304.
- Kenis, I., Tartakover-Matalon, S., Cherepnin, N., Drucker, L., Fishman, A., Pomeranz, M. and Lishner, M.** 2005. Simvastatin has deleterious effects on human first trimester placental explants, *Hum Reprod* 20(10):2866-2872.
- Kidera, Y., Tsubaki, M., Yamazoe, Y., Shoji, K., Nakamura, H., Ogaki, M., Satou, T., Itoh, T., Isozaki, M., Kaneko, J., Tanimori, Y., Yanae, M. and Nishida, S.** 2010. Reduction of lung metastasis, cell invasion, and adhesion in mouse melanoma by statin-induced blockade of the Rho/Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase pathway, *J Exp Clin Cancer Res* 29: 127.
- Koyuturk, M., Ersoz, M. and Altioek, N.** 2004. Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase, *Neurosci Lett* 370(2-3):212-217.
- Koyuturk, M., Ersoz, M. and Altioek, N.** 2007. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signalling through JNK, *Cancer Lett* 250(2):220-228.
- Larsson, O.** 1996. HMG-CoA reductase inhibitors: role in normal and malignant cells, *Crit Rev Oncol Hematol* 22(3):197-212.
- Mueck, A. O., Seeger, H. and Wallwiener, D.** 2003. Effect of statins combined with estradiol on the proliferation of human receptor-positive and receptor-negative breast cancer cells, *Menopause* 10(4):332-336.
- Riganti, C., Aldieri, E., Doublier, S., Bosia, A. and Ghigo, D. 2008. Statins-mediated inhibition of rho GTPases as a potential tool in anti-tumor therapy, *Mini Rev Med Chem* 8(6):609-618.
- Sandoval-Usme, M. C., Umaña-Pérez, A., García-Castellano, J. M., Fernández-Pérez, L. F. and Sánchez-Gómez, M.** 2010. OR5,28 GH-induced activation of JAK/STAT signaling in osteosarcoma cells is inhibited by statins through the induction of SOCS expression, *Growth Hormone and IGF Research*, 20(1 (supplemented))S13-S13.
- Sinensky, M.** 2000. Recent advances in the study of prenylated proteins, *Biochim Biophys Acta* 1484(2-3):93-106.
- Siperstein, M. D.** 1984. Role of cholesterol synthesis in DNA replication and cell growth, *J Lipid Res* 25(13):1462-1468.
- Stamm, J. A. and Ornstein, D. L.** 2005. The role of statins in cancer prevention and treatment, *Oncology (Williston Park)*, 19(6):739-750; discussion 753-734.
- Wong, W. W., Dimitroulakos, J., Minden, M. D. and Penn, L. Z.** 2002. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis, *Leukemia* 16(4):508-519.

Recibido: julio 13 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.

# DEGRADACIÓN FOTOCATALÍTICA DE FENOL EMPLEANDO ARCILLAS PILARIZADAS CON Al-Fe y Al-Cu

Jury Ñungo-Moreno<sup>1</sup>, J. G. Carriazo\*<sup>1</sup>, S. Moreno<sup>1</sup>, R. A. Molina<sup>1</sup>

## Resumen

**Ñungo-Moreno J., J. G. Carriazo, S. Moreno, R. A. Molina:** Degradación fotocatalítica de fenol empleando arcillas pilarizadas con Al-Fe y Al-Cu. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **35** (136): 295-302, 2011. ISSN 0370-3908.

En el presente trabajo se muestra la pilarización de una arcilla colombiana tipo bentonita con los sistemas Al-Fe y Al-Cu, y la evaluación de su actividad fotocatalítica en la eliminación de fenol en medio acuoso diluido. Los sólidos obtenidos se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX) y capacidad de intercambio catiónico (CIC), mostrando la efectiva modificación vía pilarización. La evaluación de la actividad catalítica de los sólidos revela el potencial de aplicación de éstos en la degradación de compuestos orgánicos contaminantes en medio acuoso mediante procesos fotoasistidos con radiación UV. Los resultados evidencian una mayor actividad fotocatalítica para la arcilla modificada con hierro y una mayor selectividad de la arcilla modificada con cobre hacia la formación de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O.

**Palabras clave:** arcilla pilarizada, fotocatalisis, oxidación de fenol, proceso foto-fenton.

## Abstract

In this work the pillaring of a Colombian natural clay (bentonite) with the Al-Fe and Al-Cu systems, and the assessment of their photocatalytic activity in the phenol elimination in aqueous solution are shown. The obtained solids were characterized by X-ray diffraction analyses and cationic exchange capacity, showing the effective modification via pillaring. The catalytic activity assessment of the solids confirms the potential application of these catalysts on the organic pollutants degradation in aqueous medium by means of catalytic processes photo-assisted with UV radiation. The results show a higher photocatalytic activity for the Al-Fe-pillared clay and a higher selectivity for the Al-Cu-pillared clay towards the formation of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O.

**Key words:** pillared clay, photocatalysis, phenol oxidation, photo-fenton process.

\* Autor de correspondencia: jcarriazog@unal.edu.co

<sup>1</sup> Estado Sólido y Catálisis Ambiental (ESCA), Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Carrera 30 Núm. 45-03, Bogotá, D. C.

## 1. Introducción

La contaminación ambiental se ha convertido en uno de los problemas más importantes de la sociedad actual; en especial la contaminación del agua es uno de los aspectos de mayor trascendencia por sus implicaciones directas sobre la vida en el planeta (Busca *et al.*, 2008; Daza *et al.* 2004). Por tal motivo, el control de contaminantes en el aire, el suelo y en las aguas, ha conducido a la formulación de reglamentaciones ambientales cada vez más severas (Ministerio de Salud-Colombia, 1984). El fenol, en particular, es uno de los contaminantes ambientales peligrosos y frecuentes en aguas residuales de industrias (químicas, petroquímicas y agroalimentarias), debido a su toxicidad, bioacumulación, poca biodegradabilidad y a su carácter cancerígeno (Garrido *et al.* 2010; Busca *et al.* 2008; Suárez *et al.* 2008; Fortuny *et al.* 1998;). Entre las tecnologías avanzadas de oxidación, el proceso Fenton, ( $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{Fe}^{3+}$ )/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , y en especial el proceso foto-Fenton, ( $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{Fe}^{3+}$ )/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /UV, han generado gran interés en los últimos años debido a su eficiencia para degradar una gran variedad de contaminantes orgánicos (Liotta *et al.*, 2009; Andreozzi, *et al.* 1999).

De otro lado, la implementación de arcillas pilarizadas con diversos sistemas de óxidos metálicos constituye, en la actualidad, un campo de amplia investigación (Garrido *et al.* 2010; Carriazo *et al.* 2010; Ksontini *et al.* 2008; Gil *et al.* 2000) debido a las enormes posibilidades en el control de la microporosidad, la eficiencia catalítica y la selectividad de estos sólidos en las reacciones de interés. Recientemente, en el grupo ESCA (Estado Sólido y Catálisis Ambiental) del departamento de química de la Universidad Nacional de Colombia, se desarrolló la síntesis de arcillas pilarizadas con los sistemas Al-Fe y Al-Fe-Ce para la oxidación catalítica de fenol en medio acuoso diluido, logrando resultados exitosos mediante la generación de un sistema tipo Fenton modificado (Carriazo *et al.* 2005). Además, Daza *et al.* (2004) y Carriazo *et al.* (2003), evaluaron arcillas modificadas con Al - Cu en esta misma reacción (sin asistencia de radiación), mostrando la potencialidad catalítica de estos sólidos. Teniendo en cuenta dichos resultados, y considerando que, tanto el  $\text{Fe}^{3+}$  como el  $\text{Cu}^{2+}$  presentan valores de energía de “band-gap” inferiores (mayor longitud de onda) al valor correspondiente para el semiconductor más conocido y utilizado en fotocatalisis,  $\text{TiO}_2$  (anatasa, band-gap  $\approx 380\text{nm}$ ), se concibió la idea de evaluar arcillas pilarizadas con Al-Fe y Al-Cu (provenientes de un mineral colombiano con explotación real) en procesos fotocatalíticos heterogéneos con potencial aplicación en la remoción de contaminantes orgánicos típicos de aguas residuales de industrias. De esta manera,

en el presente trabajo se evalúan las arcillas pilarizadas con los sistemas Al-Fe y Al-Cu en la reacción catalítica de oxidación total de fenol en medio acuoso, asistida con radiación UV. Los sólidos pilarizados se sintetizan a partir de una bentonita colombiana explotada en el Valle del Cauca y comercializada a gran escala en Colombia.

Por otra parte, aunque en literatura se encuentran algunos trabajos sobre evaluación fotocatalítica de arcillas pilarizadas o modificadas con especies de hierro, en la reacción general de oxidación de contaminantes orgánicos en medio acuoso (Iurascu, *et al.*, 2009; De León *et al.* 2008; Cheng *et al.* 2008), el empleo de arcillas de diferente procedencia puede modificar las características finales del sólido, debido a factores geoquímicos de los minerales (origen y transformación), lo cual en algunos casos favorece y en otros reduce la eficiencia de los catalizadores sintetizados. En tal sentido, la evaluación de la actividad fotocatalítica de arcillas pilarizadas preparadas a partir de la bentonita del Valle del Cauca constituye un avance en lo referente a los procesos de valorización y posible aplicación tecnológica de este mineral de interés nacional.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Síntesis de los catalizadores

**2.1.1. Material de partida:** Las arcillas pilarizadas estudiadas en el presente trabajo se prepararon mediante la modificación de una bentonita sódica, proveniente del Valle del Cauca-Colombia, utilizada en procesos anteriores (Carriazo *et al.* 2007; 2005). Esta bentonita tiene como componente principal un mineral dioctaédrico (montmorillonita) y la siguiente composición química: 9,8% Al, 22,3% Si, 6,0% Fe, 2,2% Na, 1,5% Mg, 0,4% Ca, 0,52% Ti, 38 ppm de Ce y 93 ppm de Cu (Carriazo *et al.* 2007). La arcilla natural fue triturada y tamizada (malla # 60 ASTM), para ser sometida posteriormente a separación por tamaño de partícula en suspensión acuosa (empleando la ley de Stokes) y recoger la fracción = 2  $\mu\text{m}$ . Luego se secó la fracción recogida, a 60°C, se trituró y se tamizó (malla # 80, ASTM).

**2.1.2. Preparación de las soluciones polioxo-catiónicas intercalantes:** Para llevar a cabo el proceso de intercalación-pilarización con el sistema Al-Cu, se empleó una solución acuosa preparada a partir de sales de aluminio y de cobre ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CuCl}_2$ , reactivos Merck 99%). Se partió de una solución 0,2M de  $\text{Al}^{3+}$  con la cantidad apropiada de  $\text{Cu}^{2+}$ , con el fin de obtener un porcentaje molar de Cu del 10%:  $\left[ \frac{\text{Cu}}{\text{Cu} + \text{Al}} \right] \times 100 = 10$ . Luego se adicionó a la mezcla el volumen necesario de una solución de NaOH

0,2M, en forma lenta y con agitación vigorosa, hasta alcanzar una relación molar OH/(Cu+Al) igual a 2,4. Esta solución se dejó envejecer a una temperatura de 60°C por 2 horas, con el fin de favorecer la formación de especies policatiónicas de tamaño adecuado. De la misma forma se llevó a cabo la preparación de la solución polioxocatiónica para sintetizar la arcilla pilarizada con aluminio - hierro, empleando sales de aluminio y de hierro (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O - Merck 99%), conservando el mismo porcentaje molar que

en el caso anterior (10%):  $\left[ \frac{Fe}{Fe + Al} \right] \times 100 = 10$  .

**2.1.3. Intercalación-pilarización de la arcilla:** La bentonita natural (fracción = 2 μm) se homoionizó mediante intercambio catiónico con una solución de cloruro de sodio 1N. Luego, la arcilla se hidrató por 24 horas y posteriormente se sometió a intercambio iónico con las soluciones polioxocatiónicas de Al-Cu o de Al-Fe previamente envejecidas. El proceso se realizó adicionando lentamente, y con agitación constante, la solución polioxocatiónica a una suspensión de arcilla al 2% (p/v) en agua, a temperatura ambiente. Después de culminada la adición, la suspensión se dejó envejecer por 3 horas a temperatura ambiente. Finalmente, el material obtenido se separó por centrifugación, se lavó hasta que la conductividad de la solución fuera cercana a la del agua destilada, se secó a 60°C y se calcinó a 400°C con rampa de calentamiento. Los sólidos obtenidos fueron triturados y tamizados en malla # 80-ASTM. En adelante, la arcilla pilarizada con aluminio - cobre se denominará B-AlCu y la arcilla pilarizada con aluminio - hierro B-AlFe.

## 2.2. Caracterización

**2.2.1. Capacidad de intercambio catiónico (CIC):** La determinación de la CIC de los sólidos se realizó sometiendo éstos a intercambio catiónico con una solución de acetato de amonio 2M (suspensión 1% p/v). La reacción de intercambio catiónico se realizó a temperatura ambiente, con agitación constante durante 24 horas y renovando la solución de acetato de amonio a las 12 horas. Luego, los sólidos fueron lavados por centrifugación hasta fin de acetatos, para posteriormente determinar el contenido de amonio mediante análisis micro-Kjeldahl.

**2.2.2. Difracción de rayos X (DRX):** La DRX se hizo con el propósito de determinar el incremento en el espacio basal  $d_{001}$  de los sólidos como consecuencia del proceso de pilarización. Estos análisis se realizaron en un difractómetro X Pert Pro MPD PAnalytical (radiación K $\alpha$  de Cu,  $\lambda=1,5406$  Å), con geometría 2 $\theta$  y configuración Bragg-Brentano. Los difractogramas se tomaron a temperatura ambiente, empleando la técnica de placa orientada.

**2.2.3. Actinometría química:** La actinometría química, empleada para calibrar la lámpara comercial de radiación UV (4 watts de potencia nominal) utilizada en los ensayos catalíticos, se realizó de manera convencional con el complejo ferrioxalato de potasio, K<sub>3</sub>[Fe(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>], como se indica en literatura (Goldstein y Rabani, 2008; Jankowki *et al.* 1999). Los ensayos de actinometría indicaron que la lámpara de trabajo tiene una potencia real igual a 10% de la potencia nominal, es decir 0,4 watts.

**2.3. Evaluación catalítica: reacción de oxidación de fenol en fase acuosa:** La reacción de oxidación total de fenol se llevó a cabo en dos tipos de reactores: un reactor tipo semi-batch con lámpara (UV) inmersa (figura 1a), y otro acoplado a una lámpara (UV) externa, como se indica en la figura 1b. Los dos reactores son termostatados a 25°C, equipados con agitación constante y un electrodo para controlar las variaciones de pH del medio de reacción (pHmetro Metrohm 744). Una bomba peristáltica permite la adición continua de la solución de peróxido de hidrógeno (0,1M). Para cada ensayo los reactores fueron cargados con 100mL de fenol (5x10<sup>-4</sup>M) y 0,5 g de catalizador. La solución de peróxido de hidrógeno (0,1M) fue adicionada a 2m L/h durante 4 horas. El pH fue ajustado a 3,7 en los ensayos de evaluación catalítica del sólido B-AlFe y 5,5 en el caso del sólido B-AlCu. Adicionalmente, en el reactor se burbujeó aire constantemente a razón de 2L/hora.

El flujo de recirculación del medio reaccionante a través de la lámpara externa (figura 1b) fue de 2,5 mL/minuto. En ambos reactores se emplea una lámpara comercial (de mercurio) de 0,4 watts con longitud de onda no monocromática y un rango de máxima intensidad entre 330 y 390 nm. Para seguir el curso de la conversión de fenol y la aparición de subproductos de la reacción, se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Cada muestra es previamente filtrada con filtros milipore de 0,45μm, y luego analizada en un equipo Hitachi D-7000 (LaChrom) con detector de UV-Vis y una columna Lichrosphere 60 Select B (RP8). Adicionalmente se evaluó la conversión de carbono orgánico total (COT) en un equipo automatizado AnaTOC, con el objeto de observar la degradación total de fenol hasta CO<sub>2</sub> y agua. En todos los ensayos se estimó un error relativo hasta de 4% para la oxidación de fenol a 60 minutos y para la eliminación de COT a los 120 minutos; en tiempos de reacción superiores a los indicados el error es menor.

## 3. Resultados y discusión

**3.1. Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC):** La tabla 1 resume los valores de CIC de los sólidos y la fracción

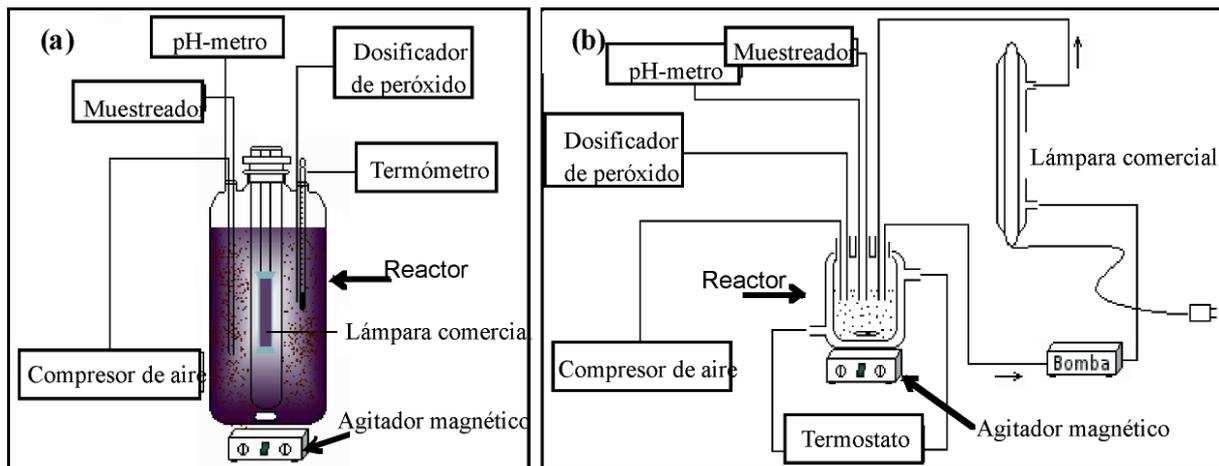


Figura 1. Montaje para los ensayos de actividad catalítica. a) Reactor con lámpara inmersa. b) Reactor con lámpara UV externa.

Tabla 1. Capacidad de intercambio catiónico para la arcilla natural y los sólidos modificados.

Sólido	CIC (meq/100g)	Fracción de carga compensada (%)
Bentonita natural	47,0	-
B-AlFe	18,2	61,3
B-AlCu	19,6	58,3

de carga compensada como consecuencia del proceso de pilarización. La capacidad de intercambio catiónico de la arcilla disminuye luego de la pilarización, lo que indica que el intercambio iónico con las soluciones polioxocatónicas fue exitoso, confirmando la incorporación de estas especies dentro de la estructura del mineral mediante interacción fuerte con las láminas de la arcilla, lo que hace que se dificulte el intercambio final de las especies por el ion amonio. La fracción de carga compensada se determinó empleando la siguiente relación:

$$\%FCC = \left[ \frac{(CIC_{inicial} - CIC_{residual})}{CIC_{inicial}} \right] \times 100$$

donde  $CIC_{inicial}$  corresponde al valor obtenido para la bentonita de partida y  $CIC_{residual}$  indica el valor de CIC para cada sólido pilarizado.

**3.2. Difracción De Rayos X (DRX):** La figura 2 muestra los perfiles de difracción para la bentonita natural y para los sólidos pilarizados. Evidentemente se observa un desplazamiento de la señal correspondiente al espaciado basal del material de partida ( $d_{001}=12,8 \text{ \AA}$ ) hacia valores

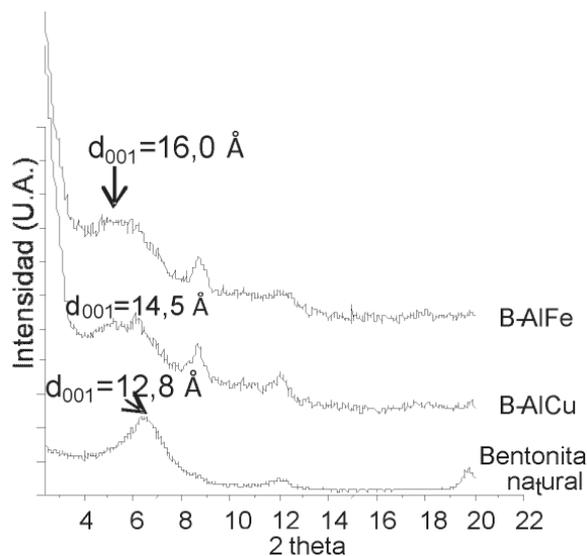


Figura 2. Difractogramas de la bentonita natural y los sólidos pilarizados.

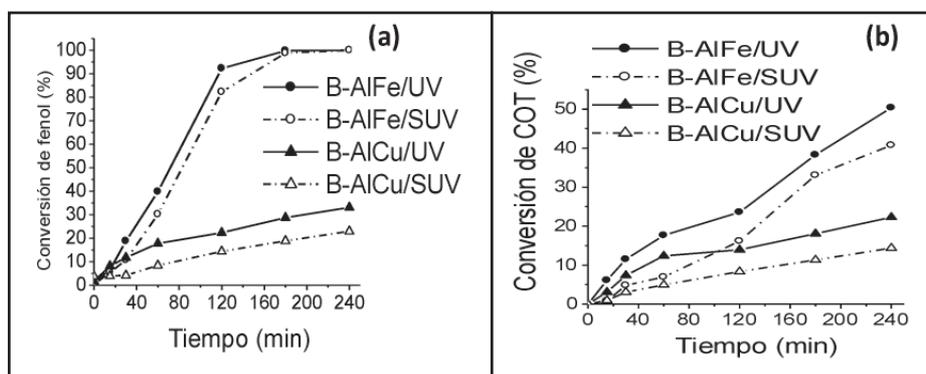
más altos ( $16,0 \text{ \AA}$  para el sistema B-AlFe y  $14,5 \text{ \AA}$  para el sistema B-AlCu), evidenciando la incorporación de pilares en los espacios interlaminares del mineral. Adicionalmente se observa que, la señal correspondiente al  $d_{001}$  de las arcillas pilarizadas es más ancha y amorfa, indicando una distribución heterogénea de los pilares incorporados en el mineral. Finalmente, la señal situada en  $2\theta=8,7^\circ$  ( $d=10,2 \text{ \AA}$ ), en los sólidos modificados, revela una pequeña fracción no pilarizada en los materiales.

**3.3. Evaluación catalítica:** La figura 3 muestra los resultados de actividad catalítica para los sólidos B-AlFe y

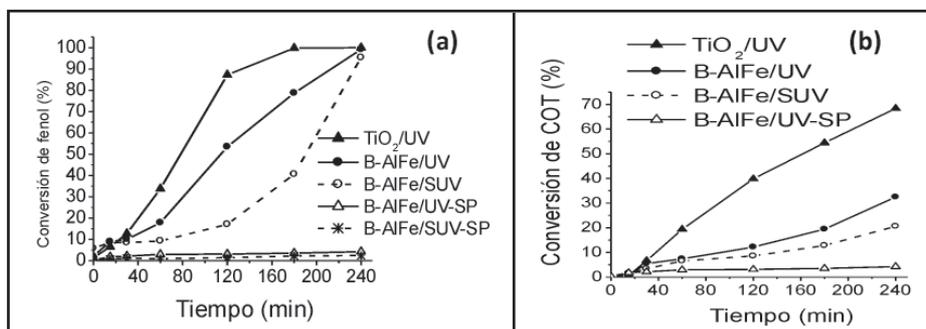
B-AlCu en el reactor tipo semi-batch con lámpara inmersa, en presencia o en ausencia de luz UV, durante 4 horas de reacción. En cada tipo de reactor se realizaron ensayos “blanco”, para observar el efecto de la lámpara UV sobre la reacción en ausencia de catalizador, encontrando conversiones de fenol despreciables en el tiempo de reacción evaluado. Los ensayos “blanco” demuestran que, en las condiciones de trabajo, el peróxido de hidrógeno (diluido) en ausencia de catalizador no es activado por los niveles (bajos) de radiación de la lámpara empleada. El aumento en la conversión de fenol (figura 3a) en presencia de los catalizadores indica que, tanto la bentonita pilarizada con Al-Fe como la arcilla pilarizada con Al-Cu presentan actividad fotocatalítica en la reacción de oxidación de fenol. Dichos resultados se confirman con el incremento en las conversiones de COT (figura 3b). Además, es necesario destacar que, los ensayos del presente estudio se realizaron con una lámpara UV de potencia muy baja (0,4 watts), en comparación con los valores de potencia reportados comúnmente en literatura, los cuales van desde 50 watts

hasta 400 watts (Cheng *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2007; Song *et al.* 2006; Crittenden *et al.* 1997) y con arreglos experimentales que incluyen más de una lámpara (De León *et al.* 2008). Esto revela una muy buena actividad fotocatalítica de los sólidos, los cuales responden con el incremento en la actividad catalítica bajo niveles menores de irradiación. En ambos casos, tanto en la conversión de fenol como en la conversión de COT, se observa un mejor desempeño catalítico de la arcilla pilarizada con el sistema Al-Fe. Además, las curvas de COT para este sólido (figura 3b) no alcanzan la forma de “meseta” (con pendiente cero) observada en la figura 3a para la conversión de fenol, lo que indica que las conversiones podrían continuar aumentando con el tiempo y alcanzar niveles superiores.

La figura 4 muestra los resultados de actividad catalítica del sólido más activo (B-AlFe) empleando el reactor de lámpara externa. En este sistema, nuevamente se verifica el incremento en las conversiones de fenol y de COT como consecuencia de la irradiación del catalizador con luz UV a



**Figura 3.** Actividad catalítica de los sólidos en el reactor semi-batch con lámpara inmersa a) Conversión de fenol; b) conversión de carbono orgánico total (COT). UV: con lámpara encendida. SUV: con lámpara apagada.



**Figura 4.** Actividad catalítica de la bentonita pilarizada con Al-Fe, empleando el reactor con lámpara externa. a) Conversión de fenol; b) Conversión de COT. UV: con lámpara encendida. SUV: con lámpara apagada. SP: sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

baja potencia. Sin embargo, se observa que los niveles de conversión son menores que los obtenidos en el sistema de lámpara inmersa, lo que puede explicarse teniendo en cuenta que en éste último, la irradiación sobre el medio de reacción es constante, mientras que en el sistema de lámpara externa la irradiación es parcial y depende del flujo de recirculación del medio de reacción.

Adicionalmente, en el sistema dinámico (reactor con lámpara externa) existen mayores limitaciones de cinética física, asociadas a las dificultades en el transporte de partículas sólidas a través de todo el sistema. No obstante, los resultados de la figura 4 indican que el catalizador es útil en un sistema dinámico, con posibilidades de optimización para ser empleado en situaciones realmente funcionales para eliminar compuestos orgánicos en efluentes acuosos residuales provenientes de industrias. Igualmente, la figura 4 muestra la actividad fotocatalítica del  $\text{TiO}_2$  (Degussa), un catalizador comercial altamente activo con propiedades reconocidas, tomado como referencia para verificar la eficiencia en el funcionamiento del sistema dinámico de reacción y comparar el comportamiento fotocatalítico del catalizador B-AlFe. Al respecto, se observan mayores diferencias en las conversiones de COT, lo que indica que el catalizador B-AlFe probablemente presenta mayores dificultades en la oxidación de subproductos de la reacción, es decir en etapas posteriores a la conversión de fenol. También es claro que, el catalizador B-AlFe muestra períodos de inducción mayores que el  $\text{TiO}_2$ , lo que revela mayores dificultades difusionales en la arcilla, máxime teniendo en cuenta que el  $\text{TiO}_2$ , a diferencia de la arcilla pilarizada, forma suspensiones más homogéneas y con menor tamaño de partícula. Además, la figura 4 muestra el papel del peróxido de hidrógeno diluido en pre-

sencia del catalizador y de radiación UV, verificando la existencia de un sistema de reacción foto-Fenton modificado: Sólido-Fe(III)/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /UV.

Por otra parte, el catalizador B-AlCu muestra resultados importantes de actividad fotocatalítica en el sistema de reacción con lámpara externa (figura 5). De nuevo se observa el incremento de las conversiones como respuesta a la irradiación del sólido con luz UV de baja potencia. Además, se verifica nuevamente el requerimiento del peróxido de hidrógeno en presencia del sólido y de radiación UV, lo cual evidencia el desarrollo de un sistema tipo foto-Fenton modificado: sólido-Cu(II)/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /UV.

Los ensayos realizados en fase homogénea, con sales de Fe(III) o Cu(II) en concentración 3 ppm en el medio de reacción (figura 6), verifican el efecto positivo de la radiación UV sobre el sistema Fenton ( $\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$ ), generando el proceso denominado foto-Fenton ( $\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$ /UV). Transcurrido el tiempo de reacción (4 horas), la conversión de fenol es del 99% con una conversión de COT del 24%; mientras que en la reacción Fenton ( $\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$ ) (sin UV) la conversión de fenol no supera el 33%. De este modo, en el proceso foto-Fenton la eficiencia en la degradación del compuesto orgánico (fenol) mejora considerablemente debido a la regeneración de Fe(II) vía foto-reducción de Fe(III), con la consecuente producción adicional de radicales hidroxilos que conllevan a la oxidación de la molécula orgánica (Turascu *et al.* 2009; De León *et al.* 2008; Ciesla *et al.* 2004; Andreozzi *et al.* 1999).

Por último, los resultados de actividad catalítica en medio homogéneo evidencian la mayor fotosensibilidad del hierro, en comparación con el cobre (figura 6), permitiendo elevar de manera muy significativa los niveles de degradación

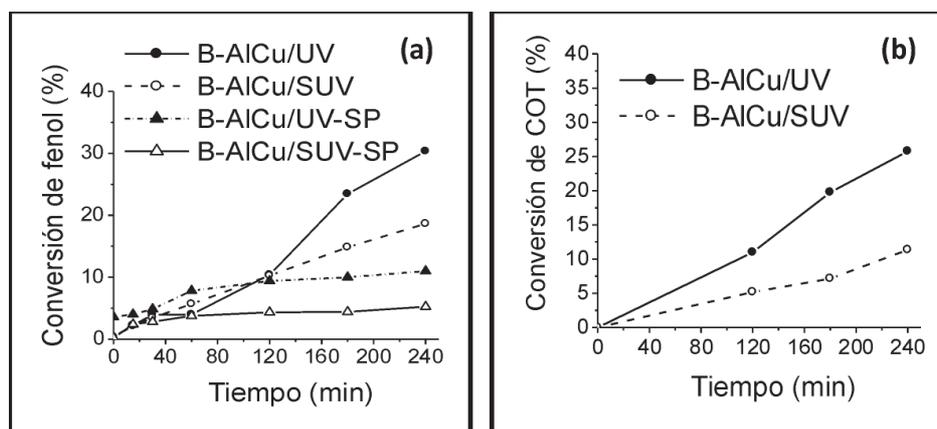
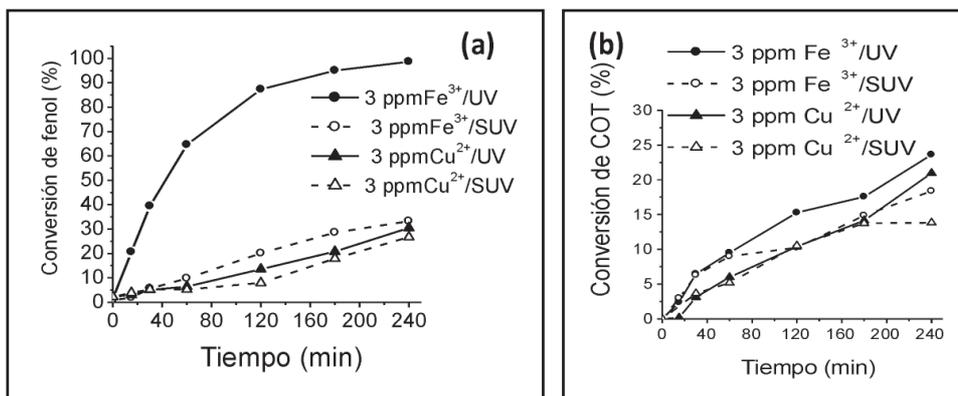
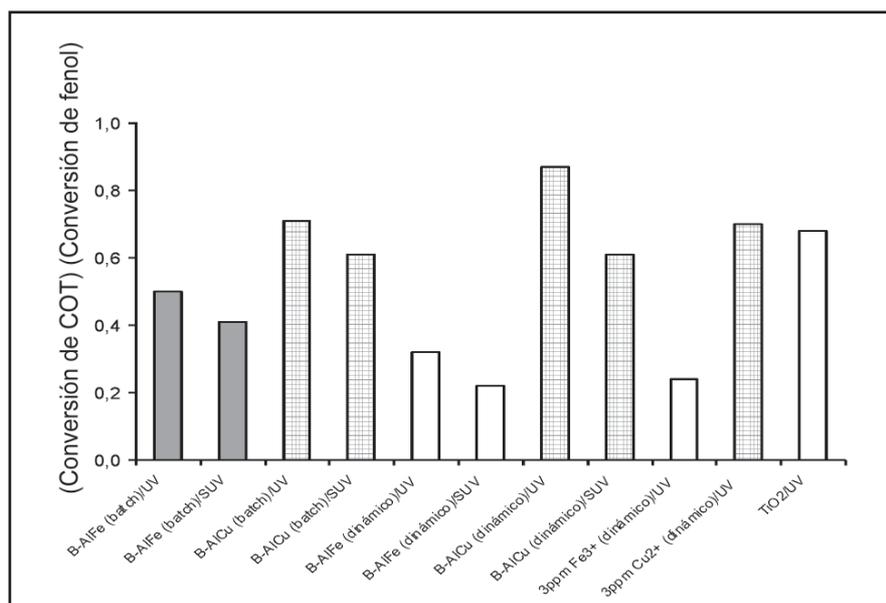


Figura 5. Actividad catalítica de la bentonita pilarizada con Al-Cu, empleando el reactor con lámpara externa. a) Conversión de fenol; b) Conversión de COT. UV: con lámpara encendida. SUV: con lámpara apagada. SP: sin  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura 6.** Actividad catalítica de las sales de cobre y de hierro, empleando el reactor con lámpara externa. a) Conversión de fenol; b) Conversión de COT. UV: con lámpara encendida. SUV: con lámpara apagada.



**Figura 7.** Relación  $\left(\frac{\text{Conversión de COT}}{\text{Conversión de fenol}}\right)$  para los diferentes sistemas catalíticos estudiados.

de fenol. Estos resultados ratifican la mayor potencialidad del sistema B-AlFe, para ser empleado como catalizador en la eliminación de fenol mediante procesos fotoasistidos con radiación UV. Sin embargo, el sistema catalítico a base de cobre (B-AlCu o Cu(II)-homogéneo) muestra un efecto favorable de selectividad, hacia la formación de CO<sub>2</sub> y agua. Dicho efecto se pone de manifiesto con las mayores relaciones  $\left(\frac{\text{Conversión de COT}}{\text{Conversión de fenol}}\right)$  en todos los ensayos catalíticos (figura 7), lo cual constituye una observación de gran interés teniendo en cuenta que revela la posibilidad de diseñar sistemas catalíticos heterogéneos mixtos a base de hierro-

cobre (arcillas con pilares mixtos), con elevada potencialidad en cuanto a actividad catalítica y selectividad hacia CO<sub>2</sub> y agua en la reacción de oxidación total de fenol fotoasistida y en medio acuoso diluido. Adicionalmente, la figura 7 muestra que la irradiación con luz UV incrementa la relación  $\left(\frac{\text{Conversión de COT}}{\text{Conversión de fenol}}\right)$ , favoreciendo la tendencia de la reacción hacia la formación de CO<sub>2</sub>.

#### 4. Conclusiones

En general, el estudio de actividad catalítica evidencia el incremento en la eficiencia de los catalizadores B-AlFe y B-

AlCu mediante la asistencia con luz UV a baja potencia, indicando claramente que la bentonita del Valle del Cauca pilarizada con Al-Fe o Al-Cu presenta importante actividad fotocatalítica en la reacción de oxidación de fenol en medio acuoso diluido, bajo condiciones suaves de temperatura y presión (25°C y presión atmosférica). Los sistemas B-AlFe y B-AlCu fotoasistidos permiten elevar los niveles de COT. Sin embargo, el catalizador B-AlFe muestra mayor actividad en la conversión de fenol que en la conversión de COT, mientras que el sólido B-AlCu presenta niveles próximos de conversión de COT y conversión de fenol.

### Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, por su financiamiento a través del proyecto “Estudio de la relación entre la estructura y las propiedades de catalizadores obtenidos a partir de minerales arcillosos” (Quipú 202010012015 de la).

### Referencias

- Andreozzi R., Caprio V., Insola A., Marotta, R.** 1999. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today* 53:51-59.
- Busca G., Berardinelli S., Resini C., Arrighi L.** 2008. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *Journal of Hazardous Materials* 160:265-288.
- Carriazo J. G., Moreno-Forero M., Molina R. A., Moreno S.** 2010. Incorporation of titanium and titanium-iron species inside a smectite-type mineral for photocatalysis. *Applied Clay Science* 50:401-408.
- Carriazo J., Molina R., Moreno S.** 2007. Caracterización estructural y textural de una bentonita colombiana. *Revista Colombiana de Química* 36:213-225.
- \_\_\_\_\_, **Guélou E., Barrault J., Tatibouët J-M., Molina R., Moreno S.** 2005. Catalytic wet peroxide oxidation of phenol by pillared clays containing Al-Ce-Fe. *Water Research*, 39:3891-3899.
- \_\_\_\_\_, **Guélou E., Barrault J., Tatibouët J. M., Moreno S.** 2003. Catalytic wet peroxide oxidation of phenol over Al-Cu or Al-Fe modified clays. *Applied Clay Science* 22:303-308.
- Cheng M., Song W., Ma W., Chen C., Zhao J., Lin J., Zhu H.** 2008. Catalytic activity of iron species in layered clays for photodegradation of organic dyes under visible irradiation. *Applied Catalysis B* 77:355-363.
- Ciesla P., Kocot P., Mytych P., Stasicka Z.** 2004. Homogeneous photocatalysis by transition metal complexes in the environment. *Journal of Molecular Catalysis A*, 224:17-33.
- Crittenden J. C., Liu J., Hand D. W., Perram D. L.** 1997. Photocatalytic oxidation of chlorinated hydrocarbons in water. *Water Research* 31:429-438.
- Daza C.E., Moreno S., Molina R.** 2004. Bentonita Colombiana modificada con Al-Cu para la oxidación de fenol en medio acuoso diluido. *Scientia et Technica* 37:265-270.
- De León M., Castiglioni J., Bussi J., Sergio M.** 2008. Catalytic activity of an iron-pillared montmorillonitic clay mineral in heterogeneous photo-Fenton process. *Catalysis Today* 133-135, 600-605.
- Fortuny A., Font J., Fabregat A.** 1998. Wet air oxidation of phenol using active carbon as catalyst. *Applied Catalysis B* 19:165-173.
- Garrido-Ramirez E.G., Theng B.K.G, Mora M.L.** 2010. Clays and oxide minerals as catalysts and nanocatalysts in Fenton-like reactions-A review. *Applied Clay Science* 47:182-192.
- Gil A., Gandía L., Vicente M. A.** 2000. Recent advances in the synthesis and catalytic applications of pillared clays. *Catalysis Reviews-Science and Engineering* 42:145-212.
- Goldstein S., Rabani J.** 2008. The ferrioxalate and iodide actinometers in the UV region. *Journal of Photochemistry and Photobiology A* 193:50-55.
- Iurascu B., Siminiceanu I., Vione D., Vicente M. A., Gil A.** 2009. Phenol degradation in water through a heterogeneous photo-Fenton process catalyzed by Fe-treated laponite. *Water Research* 43:1313-1322.
- Jankowski J., Kieber D., Mopper K.** 1999. Nitrate and nitrite ultraviolet actinometers. *Photochemistry and Photobiology* 70:319-328.
- Ksontini N., Najjar W., Ghorbel A.** 2008. Al-Fe pillared clays: Synthesis, characterization and catalytic wet air oxidation activity. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 69:1112-1115.
- Liotta L. F., Gruttadauria M., Di Carlo G., Perrini G., Librando V.** 2009. Heterogeneous catalytic degradation of phenolic substrates: Catalysts activity. *Journal of Hazardous Materials* 162:588-606.
- Martínez F., Callejas G., Melero J. A., Molina R.** 2007. Iron species incorporated over different silica supports for the heterogeneous Photo-Fenton oxidation of phenol. *Applied Catalysis B* 70:452-460.
- Ministerio de Salud.** Colombia, Decreto 1594: Normas de aguas de vertimientos. Bogotá, 26 de junio de 1984.
- Song W., Cheng M., Ma J., Ma W., Chen C., Zhao J.** 2006. Decomposition of hydrogen peroxide driven by photochemical cycling of iron species in clay. *Environmental and Science Technology* 40:4782-4787.
- Suárez-Ojeda M.E., Carrera J., Metcalfe I.S., Font J.** 2008. Wet air oxidation (WAO) as a precursor to biological treatment of substituted phenols: Refractory nature of the WAO intermediates. *Chemical Engineering Journal* 144:205-212.

Recibido: julio 5 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.

# CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE UN BIOMATERIAL MARINO CON FINES DE RESTAURACIÓN DE BIENES CULTURALES

Aida Liliana Barbosa L.<sup>1</sup>, Lucía Carmona<sup>1</sup>, Dora Carmona B.<sup>2</sup>

## Resumen

**Barbosa L. A. L., L. Carmona, D. Carmona B.:** Caracterización fisicoquímica de un biomaterial marino con fines de restauración de bienes culturales. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **35** (136): 303-314, 2011. ISSN 0370-3908.

Materiales como conchas de bivalvos y piedra coralina arrecifal constituyen la mayoría de los morteros tipo pañete de las fortificaciones de la Ciudad de Cartagena-Colombia. Un estudio fisicoquímico y espectroscópico del material (ostras), *Crassostrea Rizhophorae* (CR) y *Pinctada Radiata* (PR) fue realizado para hallar su biorreceptividad superficial y sintetizar morteros más resistentes al intemperismo. Los análisis de DRX mostraron presencia predominante de calcita y para la especie PR trazas de aragonita, esta muestra presentó mayor absorción de metales Fe y Mn, siendo indicativo de contaminación. Las impurezas orgánicas y la formación de CaO a 790°C fueron evidenciadas por TGA para la CR y 630°C para PR. Los materiales presentaron baja área superficial y microporosidad.

**Palabras clave:** conservación del patrimonio, meteorización, conchas de bivalvos, morteros antiguos.

## Abstract

Materials like bivalve shells and coral reef stone constitute the majority of plastering mortar type of old fortifications from Cartagena city, Colombia. A physical-chemical and spectroscopic material (oyster) study of *Crassostrea Rizhophorae* (CR) and *Pinctada Radiata* (PR) was performed to find their surface bioreceptiveness and synthesize more resistant mortar to the deteriorating. The XRD analyzes show calcite dominant presence in CR and aragonite traces by PR specie, which presented greater absorption of metals Fe and Mn, being indicative of contamination. Organic impurities and CaO formation at 790°C was found by TGA for CR and 630°C for PR. Materials showed low surface area and microporosity.

**Key words:** heritage conservation, weathering, bivalve shells, mortars old.

<sup>1</sup> Universidad de Cartagena- Laboratorio de Investigaciones en Catálisis y Nuevos Materiales, LICATUC- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Programa de Química, Campus Zaragocilla-Cartagena, Colombia.

<sup>2</sup> Alcaldía Mayor de Cartagena de Indias. Instituto de Patrimonio y Cultura. Centro - Calle del Tablón. Edificio González. Porto, Cartagena - Colombia.

## Introducción

Conchas de bivalvos especialmente moluscos del género *Crassostrea Rizophorae* (CR) llamada comúnmente ostra de mangle y *Pinctada Radiata* (PR) son material de desecho de explotación pesquera (Buitrago, *et al.* 2005). Debido a la alta demanda local para la ostra del mangle, (CR) se prefiere por su sabor y se sirve comúnmente en la cáscara a los turistas en las playas, siendo los bancos de ostras naturales sujetos a una explotación alta. (Lacerda, *et al.* 1987), (Brumbaugh, *et al.* 2009). Estas prácticas pesqueras destructivas alteran directamente su estructura física y conlleva la generación de un desecho medioambiental subutilizado, particularmente abundante en zonas de explotación insulares del Caribe y Sur América, (Carranza, *et al.* 2009a) el cual se incrementará en la próxima década, si se estima que más del 85% de los bancos de ostras naturales están en vía de extinción. (Brumbaugh, *et al.* 2009). Este tipo de biomaterial meteorizado fue utilizado en la época hispánica como constituyente en todas las fortificaciones antiguas a lo largo de las costas de América Latina y posee una capacidad de filtración y biocumulación de metales alta, además de agregarse reduciendo la erosión. Estudios previos muestran que las partículas suspendidas del metal se acumulan en una fracción no soluble que probablemente esté asociada con gránulos amorfos, constituyentes de su caparazón y su concentración depende de las condiciones medioambientales. (De Freitas, *et al.* 2003) Dichas características morfológicas conducen al deterioro de morteros de pega antiguos y rocas constituyentes de las fortificaciones, facilitándose la formación de un biofilm cuyos microorganismos pueden llevar a la biosolubilización del material y posterior apertura de oquedades, que producen el colapso de la roca y desplome de la estructura. Para caracterizar la durabilidad de un material, es adecuado hacer el estudio de su bioreceptividad, definida como la aptitud de un material para albergar, desarrollar y multiplicar uno o distintos grupos de organismos vivos, siendo excluida la capacidad de un material para recibir organismos de manera fortuita. Entre los materiales de construcción, tal vez el mortero es el más bioreceptivo como se observa en edificios y monumentos y en pruebas de laboratorio. (Saiz-Jiménez, *et al.* 2008), (Macedo, *et al.* 2009)

En la actualidad, los monumentos históricos están siendo sometidos a restauraciones y reparaciones; numerosos aditivos químicos como el hidróxido de bario (Karatasios, 2010), óxido de titanio, (Karatasios, *et al.* 2006), sílice fumante (Caliskan, 2003), hidroximetil celulosa, derivados de la goma arábiga (Izaguirre, 1993), oleato de sodio y estearato de calcio (Izaguirre, 2009), han sido propuestos

para mejorar su resistencia frente a los vectores ambientales como humedad, salinidad y temperaturas altas, además de la polución medioambiental. La protección de los morteros se dirige principalmente a evitar la humedad, ya que cuando el agua se evapora y deja sales que crecen dentro de los poros de las rocas, provocan microfracturas que se propagan dañando el material: este fenómeno ocurre durante y después de las estaciones lluviosas. Las partículas pulverulentas o del suelo (< 200 micras) al depositarse en las fachadas de los edificios los destruyen, no sólo por ellas en sí mismas sino porque van acompañadas de la velocidad alta de los vientos que las transportan (Leuzzi, *et al.* 1998). Los restauradores prefieren materiales nativos que suelen ser más compatibles con los existentes en las fortificaciones, debido a que los productos orgánicos y organominerales (también conocidos como organosilícicos) pueden resultar eficaces a corto y mediano plazo (Gómez-Villalba, *et al.* 2011); por lo tanto en el presente trabajo se recolectaron especies mayoritarias de bivalvos constituyentes de la muralla de Cartagena de Indias-Colombia en estado natural y con fines comparativos se tomaron muestras removidas en procesos de restauración, las cuales fueron donadas por el Instituto de Mejoras Publicas de Cartagena de Indias con fines de investigación. Se empleó una combinación de técnicas físicas, químicas y espectroscópicas, microscopía electrónica de barrido con microanálisis de energía dispersiva, análisis de calcinación utilizando TGA y Difracción de Rayos X para encontrar fases cristalinas en las muestras frescas y en las obtenidas del monumento histórico. Se evaluaron las propiedades morfológicas y texturales que permitieran estudiar la resistencia de las conchas de bivalvos al biodeterioro ejercido por los microorganismos, gases ambientales y el intemperismo; al mismo tiempo se analizó la viabilidad de las conchas como agente para restaurar, mediante la obtención de un mortero de prueba. Los resultados se constituyen como insumo para la protección de morteros antiguos existentes, que puede ser utilizado por los restauradores e interventores de estos bienes patrimoniales.

## Materiales y métodos

### Selección del área de estudio

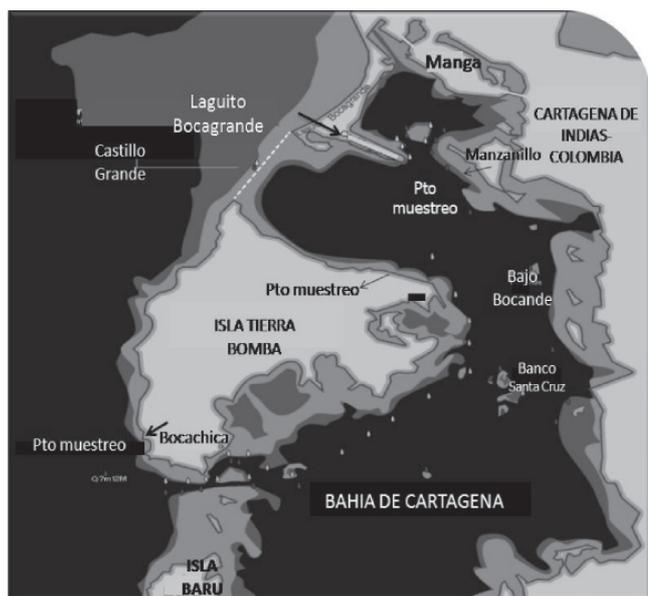
Fueron seleccionados tres lugares de muestreo, dos de ellos en la zona Insular de Cartagena-Tierra Bomba, sitio de acopio de la piedra coralina arrecifal con que fueron construidas las fortificaciones de Cartagena de Indias; el tercer lugar de recolección fue San Antero-Córdoba; estas muestras fueron usadas como blanco, porque no poseían intervención humana y estaban alejadas de contaminantes medioambientales; el tipo de material seleccionado fue

conchas de bivalvos con un alto grado de meteorización; las especies recolectadas fueron abundantes en el medio y la frecuencia de muestreo fue una vez, cada tres meses por espacio de seis meses. El área definida de muestreo fue 3 m de la línea costera en toda la extensión de las playas seleccionadas y se recolectaron muestras en seis puntos, en los cuales hay presencia abundante de las especies a utilizar.

### Toma de muestras

Muestras de *Crassostea Rhizophorae* (CR) entre 5 cm y 15 mm de longitud y *Picnata Radiata* (PR) entre 2 cm y 5 cm de longitud fueron recolectadas en la Isla de Tierra Bomba sector este y oeste de Bocachica, figura 1, y San Antero Córdoba (Playa Caño de Lobo). Estas fueron trasladadas al laboratorio de Investigación en Catálisis y Nuevos Materiales LICATUC de la Universidad de Cartagena-Colombia y colocadas dentro de cestas plásticas de dimensiones (60 x 40 x 15 cm), para ser sometidas a lavados exhaustivos con agua potable y agitación por dos días, con la finalidad de extraer residuos de arena y remover parte del biofilm.

Se seleccionaron las ostras más limpias con tallas promedio de  $2,05 \pm 0,5$  cm y se utilizó otro protocolo de limpieza para retirar el biofilm a profundidad, el cual consistió en un lavado y cepillado de las conchas utilizando jabón, enjuagando con abundante agua por espacio de 24 horas en agitación; las muestras fueron secadas al sol por 1 día y se



**Figura 1.** Mapas de la ciudad de Cartagena de Indias. Las flechas señalan la ubicación del corregimiento de Bocachica en la isla de Tierra Bomba y Manzanillo. Cartagena-Bolívar.

observaron nuevamente en el microscopio óptico con un aumento de 1000x, para verificar la presencia de biofilm resistente al lavado; en algunos casos se hizo necesario una limpieza exhaustiva con una mezcla etanol-acetona por 24 horas para retirar impurezas de naturaleza orgánica. Las muestras limpias fueron molidas mecánicamente y tamizadas a 100 mesh, para los análisis químicos y espectroscópicos de las muestras frescas y calcinadas a 700°C por 12 h. Para las conchas recolectadas sobre el patrimonio, el método más adecuado fue la extracción de testigos mediante un raspado con espátulas asépticas (scrapping) (Herrera, *et al.* 2002) y posterior remoción de la roca coralina arrecifal; la muestra fue separada en dos fracciones; una de ellas fue lavada con el protocolo de limpieza descrito anteriormente, para remover a profundidad el biofilm y realizar el análisis de los componentes inorgánicos en el biomaterial y otra parte fue analizada directamente al microscopio óptico, (Herrera, *et al.* 2002); se tuvo la precaución de envasar las muestras en un material de plástico para conservar su humedad y evitar su carbonatación. (Carmona, *et al.* 2005), (Barbosa, *et al.* 2007, 2007a).

### Caracterización físicoquímica del material recolectado

Para determinar la composición química y algunas características mineralógicas de las muestras de materiales meteorizados, se utilizaron técnicas analíticas y espectroscópicas tales como: análisis termogravimétrico, mediante un equipo ATG Q 500 TA Instruments, con una velocidad de incremento de temperatura de 20°C/min; análisis por difracción de rayos X, con un difractómetro de polvo Bruker D8 Advance, dotado con anticátodo de radiación monocromática de Cu,  $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ , 40 kV y 30 mA, con una constante de tiempo 2.0 segundos y un paso angular de 0.100 grados para  $2\theta$ ; y ME con un Microscopio de Barrido, con sonda AutoProbe, cp-park Scientific Instruments. El área superficial del material meteorizado fresco y calcinado a 500°C, fue hallada por el método de la isoterma B.E.T, usando un equipo marca Gemini Micromeritics 2000. El contenido de los minerales en el mortero de prueba fue encontrado por absorción atómica, utilizando un equipo Perkin Elmer Analyst 300. Estudios de microscopía óptica para la textura de las muestras, se realizaron con ayuda del equipo Nic Plan Nicolet con cámara digital acoplada, usando un ocular tipo Whk 10x/20L.

### Obtención del mortero de prueba

Con la finalidad de ensayar el material para aplicaciones posteriores en restauración de edificaciones antiguas, las muestras de ambas variedades de conchas fueron tamizadas a 120 mesh y calcinadas a 500°C. En una proporción

adecuada, fueron sometidas a un apagado agregando agua, dejando esta mezcla por espacio de quince días, agitando en forma discontinua, con el fin de obtener la cal hidráulica. Con este material, se procedió a la fabricación de los morteros mediante la adición de arena previamente caracterizada y tamizada por malla 100 mesh, variando la proporción de cal y arena y adicionando agua hasta obtener una pasta homogénea, trabajable y con fluidez adecuada. Se dejó fraguar por siete días y se procedió a caracterizarlo por técnicas mecánicas como resistencia mecánica a la compresión y pruebas químicas como absorción atómica y pruebas espectroscópicas como DRX y SEM.

## Resultados y discusión

### Aspecto físico de las muestras recolectadas

Las conchas de la especie *Crassostrea Rizophoreae* (*CR*), (figura 2, izquierda), presentaron una forma alargada y estrecha con una textura más frágil y quebradiza, superficie rugosa, sin ninguna uniformidad; su tamaño en comparación con la especie *Picnata Radiata* (*PR*) (figura 2, derecha), fue mayor y normalmente se encontraba agregada, formando un ensamble compacto propio de la ostra de mangle. Algunas de las muestras recolectadas presentaron porosidades de 1 mm de diámetro producidas por la intemperie y procesos de meteorización. La especie *Picnata Radiata* (*PR*) registró menor abundancia que la

*PR* en las zonas de muestreo; su forma es redondeada con una superficie rugosa y canales ordenados, no posee oquedades ni poros macroscópicos (propios del deterioro mecánico y/o procesos de meteorización), lo que refleja una mayor resistencia que la *CR*, una mayor dureza y menor fragilidad a la molienda. (Carmona, *et al.* 2005), (Barbosa, *et al.* 2006).

Las muestras antiguas de conchas de bivalvos fueron obtenidas en el Baluarte de Santiago del cordón amurallado de Cartagena –Colombia (Figura 3) y presentaron una forma estrecha y alargada, con patinas de color negro conocidas como biofilms, (Videla, 2003), también llamada costra negra (Pérez, *et al.* 2005); en estas conchas fueron observadas grietas propias de procesos avanzados de meteorización y su dureza fue variable.

La especie *PR* conserva su forma redondeada acanalada y en ella fue observado un avanzado estado de meteorización, con desprendimiento de carbonato de calcio en polvo, (figura 3 derecha), señal de biomineralización de los materiales recolectados, (Carmona, *et al.* 2005), (Barbosa, *et al.* 2006, 2007a). Debido al poco material especiado, este fue analizado solamente por microscopía óptica y superficie específica, para lo que se diseñó una celda de vidrio que permitió colocar el espécimen completo; estos resultados fueron reportados con fines comparativos para evaluar cualitativamente el deterioro que ha sufrido frente al intemperismo.

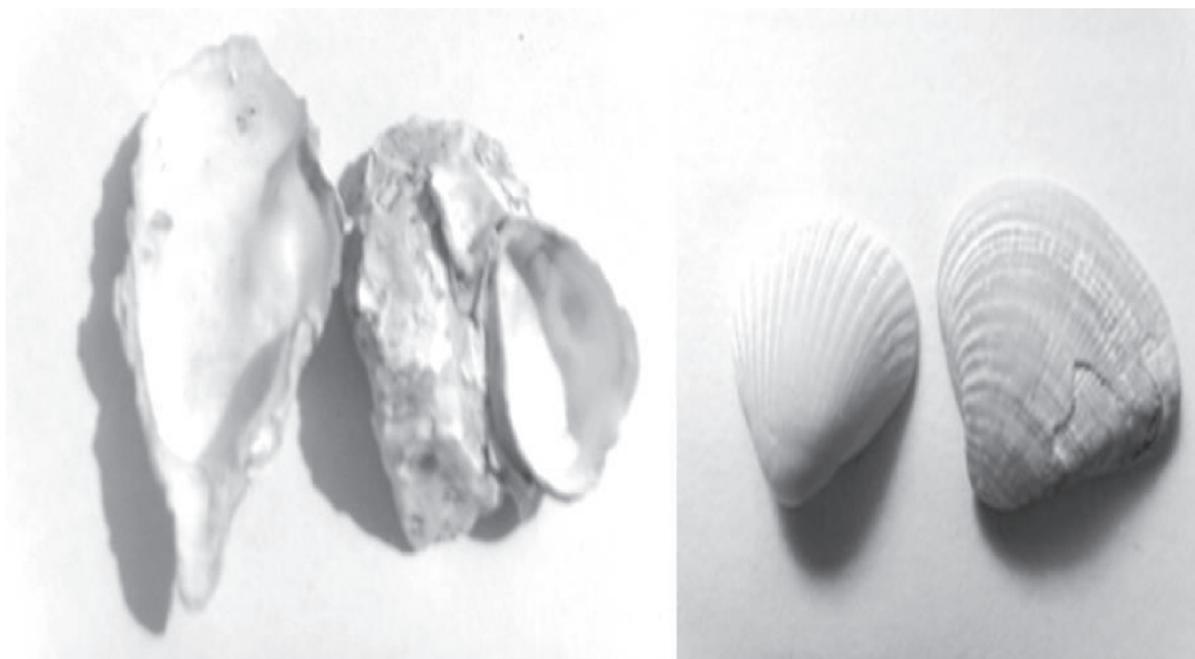


Figura 2. Especies de bivalvos recolectados, *Crassostrea Rizophoreae* (izquierda) y *Pinctada Radiata* (derecha).

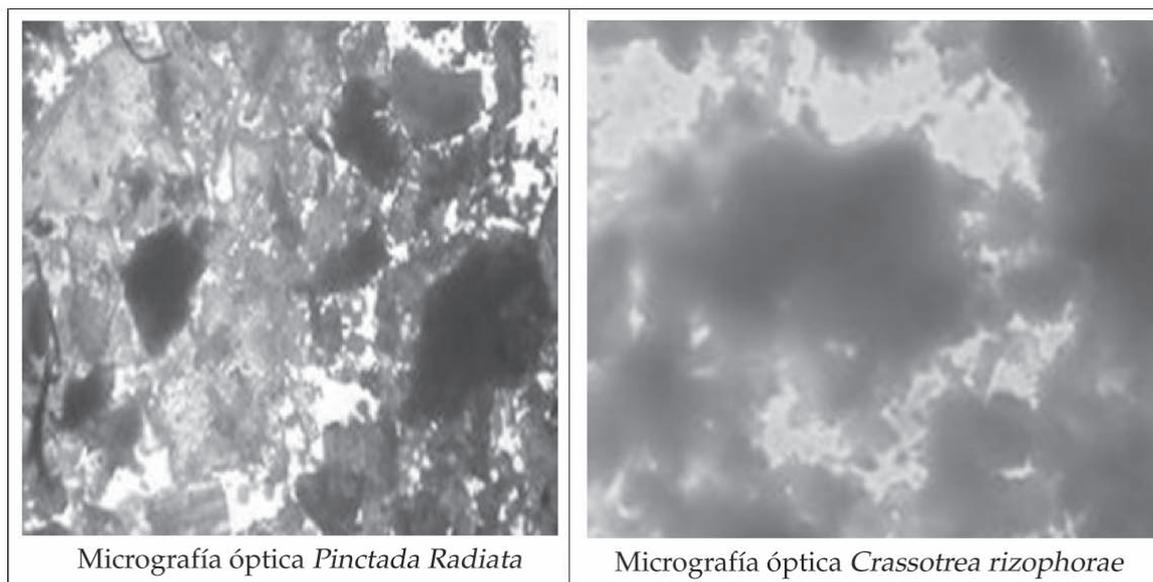


**Figura 3.** Especies de bivalvos recolectados en el Baluarte de Santiago (trabajos de restauración 2007), *Crassostrea Rizophorae* (izquierda) y *Pinctada Radiata* (derecha).

#### Caracterización fisicoquímica del material de las conchas marinas meteorizadas

El estudio por microscopía óptica revela diferencias en el aspecto morfológico de ambas muestras como se aprecia en la (figura 4).

La figura 4 muestra los resultados de microscopía óptica de luz transmitida de las especies previamente tamizadas, sin lavado con solventes; en estas imágenes se apreció que *PR* presentó una estructura masiva constituida mayoritariamente por cristales anhedrales de  $\text{CaCO}_3$  de 4 mm hasta 20 mm. En menor proporción, fueron identifica-



**Figura 4.** Micrografías en microscopio óptico de la concha de bivalvos de las especies *Crassostrea Rizophorae* (derecha) y *Pinctada Radiata* (izquierda) antes del tratamiento de calcinación.

dos cristales anhedrales más pequeños, superiores a 100 mm, que podrían ser correspondientes a la fase magnésita o dolomítica, lo que se corroboró por medidas posteriores de absorción atómica, que mostraron trazas de magnesio y otros elementos. Fueron identificados, además, poros con morfología más irregular y de mayor tamaño, que generaron formas subredondeadas y alargadas. De igual forma, se apreciaron filamentos correspondientes a material orgánico depositado. En la microfotografía óptica de la especie *CR* se evidenciaron cristales amorfos de mayor tamaño, superiores a 700 mm, producto de una facilidad mayor para agregarse y procesos de cementación de la porosidad. (Barbosa, *et al.* 2005), (López-Arce, *et al.* 2010), (Gómez-Villalba, *et al.* 2011).

### Caracterización por medida de superficie específica

En la tabla 1 se pueden apreciar el área superficial de los materiales utilizando el método B.E.T; los constituyentes de las conchas reportaron una superficie específica muy baja indicando poca capacidad adsorbente y naturaleza microporosa. Mediante el análisis del parámetro C, relacionado con la energía de absorción, para el patrón de  $\text{CaCO}_3$  el valor fue

**Tabla 1.** Superficie específica del material marino fresco y proveniente de la muralla sin calcinar con los distintos tratamientos de limpieza empleados.

Muestra	Área superficial $\text{m}^2/\text{g}$	Valor C
$\text{CaCO}_3$ patrón	1,2	8,54
CRST-50	4,0	66,33
CRETOH-50	5,1	51,29
CRH <sup>+</sup> -50	7,2	51,49
PRST-50	1,3	35,98
PRETOH-50	1,7	22,66
PRH <sup>+</sup> -50	1,1	20,51
CR-M	3,8	55,60
PR-M	1,2	18,87

*CaCO<sub>3</sub> Patrón:* Estándar externo de carbonato de calcio; *CRST-50* *Crassostrea Rhizophorae (CR)* sin tratamiento, pasado por tamiz malla 50; *CRETOH-50* *Crassostrea Rhizophorae (CR)* con tratamiento etanólico pasado por tamiz malla 50; *CRH<sup>+</sup>-50* *Crassostrea Rhizophorae (CR)* con tratamiento ácido pasado por tamiz malla 50; *PRST-50* *Pinctada Radiata (PR)* sin tratamiento, pasado por tamiz malla 50; *PRETOH-50* *Pinctada Radiata (PR)* con tratamiento etanólico pasado por tamiz malla 50; *PRH<sup>+</sup>-50* *Pinctada Radiata (PR)* con tratamiento ácido pasado por tamiz malla 50; *CR-M* *Crassostrea Rhizophorae (CR)* sin tratamiento, pasado por tamiz malla 50 extraída de roca de la muralla trabajos de restauración 2007, Baluarte de Santiago; *PR-M* *Pinctada Radiata (PR)* sin tratamiento, pasado por tamiz malla 50 extraída de roca de la muralla trabajos de restauración 2007, Baluarte de Santiago.

pequeño (8,5) mientras que para las muestras estudiadas el valor se incrementó notablemente (tabla 1); para la especie *CR*, fue el doble en magnitud que en la especie *PR*, lo que explicaría el fácil deterioro que la *CR* tiene por su intercambio de humedad con el medio. Los tratamientos de limpieza con ácidos diluidos o solventes orgánicos dejaron los materiales más expuesto al medio, reportando un valor menor de C, en tanto que la especie *PR* sería un material más duro e impermeable, aún con tratamientos de limpieza con ácidos minerales diluidos o con solventes orgánicos. Las muestras meteorizadas extraídas de la muralla registraron aéreas superficiales bajas con un margen de diferencia muy pequeño, en relación con las muestras meteorizadas recolectadas en la playa.

Una vez realizada la calcinación a 500°C para las especies de bivalvos estudiados y tamizados malla 50, fue observada una pérdida de área ligeramente mayor en la *CR*, (tabla 2), en tanto que la especie *PR* resultó ser un material más estable, cuya área superficial se mantuvo después de los procesos de calcinación.

**Tabla 2.** Área superficial del material marino *Crassostrea Rhizophorae (CR)*, *Pinctada Radiata (PR)* calcinado 500°C.

Muestra	Área superficial $\text{m}^2/\text{g}$	Valor C
CRST-50	1,81	48,12
PRST-50	1,03	28,20

Debido a las áreas superficiales bajas y valores de C relativamente altos nos indican la posible presencia de microporos, los cuales han permitido una mayor estabilidad del material, frente a la humedad y a la absorción de contaminantes del medio.

### Análisis termogravimétrico

Los resultados de estabilidad térmica para la muestra *Crassostrea Rhizophorae* sin tratamiento, que pasó por el tamiz 50-(*CRST-50*), son apreciados en la figura 5; la muestra presentó una pérdida de peso  $\text{Dm} = \pm 44\%$  correspondiente a humedad y  $\text{CO}_2$ , proveniente de la descomposición del carbonato de calcio y de componentes orgánicos tales como proteína que puede encontrarse en el material húmedo hasta un 8,6%, compuestos de naturaleza lipídica en un 1,1% y carbohidratos alrededor de 0,8% (Milano, *et al.* 2005); a 790°C el carbonato se descompuso totalmente para dar óxido de calcio, (ecuación 1) y el material de ceniza para esta especie fue 3,3%; los resultados de absorción atómica registraron la presencia de trazas de potasio y magnesio que son acordes con resultados propuestos para este tipo de materiales. (Milano, *et al.* 2005).

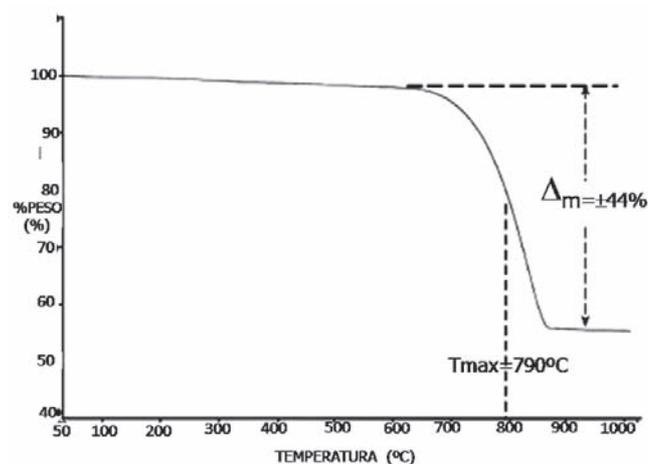


Figura 5. Análisis termogravimétrico de la muestra *Crassostrea Rizophorae* sin tratamiento, tamizada 50 mesh.

En el caso de la *Pinctada Radiata* sin tratamiento pasada por el tamiz 50 (PRST-50), (figura 6), se observaron varios puntos de inflexión en el termograma, propios de una composición más compleja, y elementos presentes en base húmeda en porcentajes más altos como proteínas y lípidos entre 4 y 14%; el termograma mostró una pérdida de peso cerca de 100°C correspondiente a humedad, puesto que este tipo de especie posee entre 2 y 4% de agua en base húmeda (Al-Madfa, *et al.* 1998).

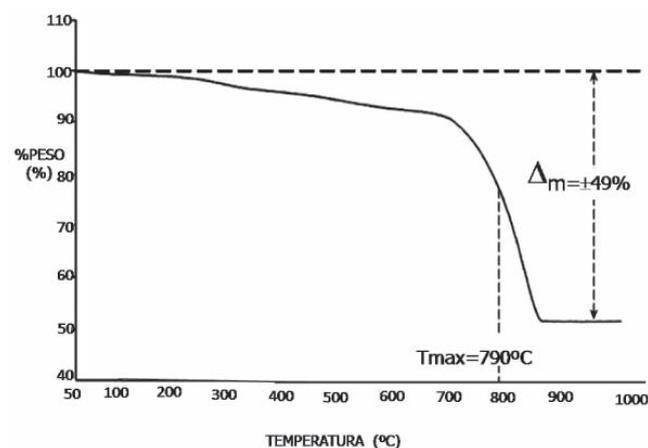


Figura 6. Análisis termogravimétrico de la muestra *Pinctada Radiata* sin tratamiento, tamizada 50 mesh.

Otro punto de inflexión se registró entre 250°C y 350°C correspondiente a la descomposición de materia orgánica, salida de amoníaco y gas carbónico originando una pérdida de peso ligeramente mayor que CR-50, con un  $\Delta m = \pm 49\%$ ; con la salida rápida de los componentes, la formación del óxido de calcio tuvo lugar a 630°C, lo que mostraría una

menor resistencia térmica de este material a la descomposición. Otro factor que podría influir en la obtención de una menor temperatura del óxido de calcio es la presencia de trazas de metales como hierro, magnesio y zinc que podrían catalizar la formación temprana del CaO, reacción 1.



### Análisis por difracción de rayos X

Con la finalidad de encontrar las fases cristalinas presentes en cada una de las muestras, se analizaron los difractogramas (figuras 7 y 8) del material marino meteorizado triturado y tamizado, malla 50 sin tratamiento; podemos observar que las dos especies son materiales altamente cristalinos y poseen una mayor proporción de picos característicos del  $\text{CaCO}_3$  tipo romboédrico, en la fase calcita con señales características en  $2\theta = 29,34^\circ$ ;  $39,41^\circ$ ;  $43,16^\circ$ ;  $47,11^\circ$  (según PDF, No. 471743, base de datos JCPDS usando el software PCPDFWIN versión 2.02); para la *Crassostrea Rizophorae* y  $29,40^\circ$ ;  $35,97^\circ$ ;  $39,41^\circ$ ;  $43,16^\circ$ , para la *Pinctada Radiata*, los picos de menor intensidad indican, la presencia de cristales de calcita con planos con diferente orientación, pero que mantienen su forma romboédrica. Para la muestra de (PR) podemos ver señales a valores de  $2\theta$  de  $2,94^\circ$  y  $26,06^\circ$  correspondientes a carbonato de magnesio.

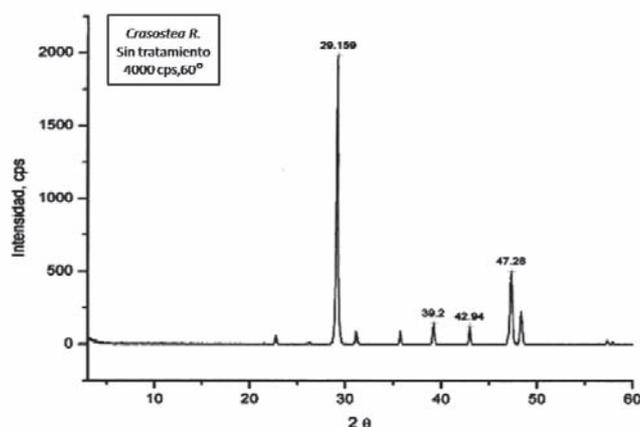


Figura 7. Difractograma de la muestra *Crassostrea Rizophorae* sin tratamiento, tamizada 50 mesh.

Por otro lado, la especie *Pinctada Radata* (figura 8) mostró una señal de gran intensidad,  $I = 700$  cps y  $2\theta = 29.40^\circ$ , característica para la calcita y otros picos importantes a  $2\theta = 35.97^\circ$ ,  $39.41^\circ$ ,  $43.16^\circ$ , y  $47.50^\circ$  asociados con un sistema romboédrico (según PDF No. 471743 base de datos JCPDS). Algunos picos adicionales fueron evidenciados y asociados con la fase aragonita de  $\text{CaCO}_3$  con

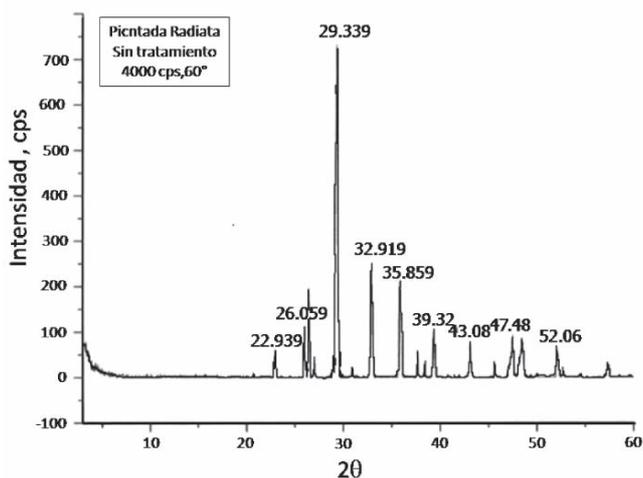


Figura 8. Difractograma de la muestra *Pinctada Radiata* (PR) sin tratamiento, tamizada 50 mesh.

señales características en  $2\theta = 26.06^\circ$ ,  $22.94^\circ$  y  $52.45^\circ$  (García-Heras, *et al.* 2006).

Las dos especies fueron sometidas a un tratamiento de lavado con etanol acetona y ultracentrifugación por cinco minutos; se tomó el espectro de rayos X para la especie PR y se observaron picos relacionados con trazas de  $\text{CaCO}_3$  en otras formas cristalinas como aragonita con picos en  $2\theta = 26,10^\circ$ ;  $36,04^\circ$ ;  $52,45^\circ$  (PDF No. 471734 de la base JCPDS) y picos para la fase cristalinas vaterita en  $2\theta = 27,5^\circ$  y  $33,11^\circ$ , (PDF No. 741867 de la base JCPDS); la existencia de estas dos fases esta relacionada con una inestabilidad estructural debida a un crecimiento cristalino distinto, el cual podría afectar los resultados de comportamiento hídrico, una vez esté incorporada en el mortero y que al ser utilizado como material consolidante, propicie una mayor fragilidad de la roca constituyente de los monumentos, facilitando su fractura (García-Heras, *et al.* 2006); una mayor intensidad de las señales de la fase calcita de la especie CR con relación a la especie PR podría estar asociada con una mayor facilidad para ser meteorizada.

### Caracterización del mortero de prueba

Una vez caracterizadas fisicoquímicamente las conchas de bivalvos, se realizaron ensayos de obtención de morteros tipo pega a partir de estas materias primas para determinar su factibilidad como agente consolidante en las reparaciones a monumentos antiguos. En la fabricación de los morteros se utilizó arena de río proveniente de la cantera Rotinex, del municipio de Repelón, Atlántico, y se adquirió como arena para pañete, la cual presentó características de finura cuyo tamizado dio un valor de  $74 \mu\text{m}$ ,

diferente a la utilizada en la fabricación de hormigones y estructuras. Para la obtención del mortero de prueba, se tomó un peso de arena seca de 685.0g, el cual pasó por el tamiz de 200 mesh un 0,45%, como se muestra en la tabla 3 (Ashurst, 1993), (Useche, 1990), (Useche, 1993).

Se escogió como mezcla trabajable 75% de polvo tamizado 100 mesh de *Pinctada Radiata* y 25% del polvo tamizado 100 mesh de *Crassostrea Rizophorae*, mezclando con arena en una proporción 1:2, la cal obtenida se apagó con suficiente agua en cantidades estequiométricas según la reacción de la reacción 2. (Garate, 1999).



Esta relación la denominamos mortero 1:2, el cual se ensayó para su resistencia a la compresión obteniéndose un valor de  $3 \text{ kg/cm}^2$ , el cual estuvo en el rango esperado para un mortero tipo pañete, según la norma específica ICONTEC 119 de 1981 (Useche, 1990). La homogeneidad y propiedades morfológicas del mortero fueron analizadas por microscopía de barrido electrónico (SEM), (figura 9), está mostró cristales de coloración brillante posiblemente de portlandita, generados durante la preparación, esta fase fue reportada en el análisis DRX. Se registraron, además, diferencias en el tamaño de cristalitas de portlandita, desde micrómetros a partículas nanométricas en un rango 1,12 mm y 910 nm, registradas en la microfotografía con un aumento de 4000X, también se pudo concluir que la mezcla de cal utilizando las dos especies que resultó ser más homogénea, fue la que presentó mayor proporción de *Pinctada Radiata*, (75% *Pinctada Radiata* y 25% *Crassostrea Rizophorae*).

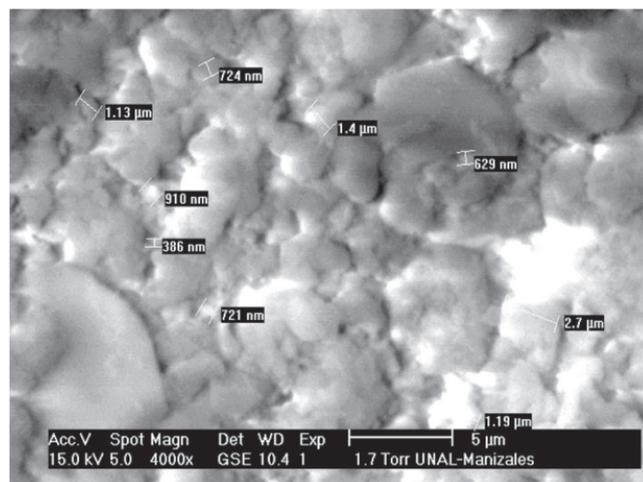


Figura 9. Cal formada por 75% *Pinctada Radiata* (PR) y 25% *Crassostrea Rhizophorae* (CR) calcinada  $1100^\circ\text{C}$  y apagada por quince días (microfotografía 4000x).

**Tabla 3.** Tamaño de partícula de arena para pañete proveniente de la cantera Rotinex.

Tamiz (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido	% Retenido acumulado	% pasa
4,75	10,13	1,5	1,50	98,50
2,38	24,45	3,62	5,12	96,38
1,19	105,96	15,69	20,81	84,30
0,60	53,72	7,95	28,76	71,25
0,30	354,25	52,44	81,12	18,81
0,15	75,46	11,17	92,37	7,68
0,07	48,60	7,19	99,56	0,45
Fondo	2,92	0,44	100	0
Total	675,48	100		

Los análisis de composición por absorción atómica de la cal hidráulica, se presentan en la (tabla 4).

Se destacaron la presencia de Ca, Al y Fe, obtenidos para las dos especies, se pudo afirmar que la especie *Crassostrea Rizophorae*, presentó un grado mayor de meteorización en relación con la *Pinctada Radiata*, que mostró un mayor porcentaje de Ca ( $53,1 \pm 2.0$ ), de igual forma ambas especies poseían pequeñas concentraciones de Al y Fe, los cuales fueron relativamente mayores para la especie *Pinctada Radiata*, lo cual podría ser conveniente para acelerar el proceso de fraguado. Cabe resaltar que los porcentajes altos de calcio encontrados para las especie en estudio, confirman que estas pueden ser usadas como fuente de  $\text{CaCO}_3$ , para la obtención de cal hidráulica luego de haber sufrido el proceso de meteorización.

#### Caracterización por difracción de rayos X del mortero obtenido

La figura 10, muestra el patrón de difracción del mortero de cal con composición 1:2, correspondiente a la mezcla

de 75% de la especie *Pinctada Radiata* y 50% de *Crassostrea Rizophorae* y arena, se apreciaron picos característicos del  $\text{CaCO}_3$  en la fase calcita, con señales características en  $2\theta = 29,34^\circ; 39,41^\circ; 43,16^\circ; 47,11^\circ$  (según PDF, No. 471743, base de datos JCPDS), también se evidenció una señal para el aluminio silicato de sodio y calcio, albita,  $(\text{Na,Ca})\text{Al}(\text{Si,Al})_3\text{O}_8$ , (sistema triclinico), en un ángulo  $2\theta = 28.04$ ,  $I = 420\text{cps}$ , (según PDF No. 832467 base de datos JCPDS). El proceso de fraguado formo un compuesto de zinc – hierro  $\text{Fe}_3\text{Zn}_{10}$ , (cúbico), con señales características en  $2\theta = 42.49^\circ$  e  $I = 190\text{cps}$ , (según PDF No. 710399, base de datos JCPDS). Adicionalmente, se obtuvieron señales para la portlandita con picos característicos en  $2\theta = 18,18^\circ; 28,40^\circ; 34,18^\circ; 47,24^\circ; 50,96^\circ$  (según tarjeta No. 4-733, tomado del Mineral power diffraction, editado por el centro Internacional para la Difracción de rayos X y publicado por JCPOS en 1990, USA) (Gómez-Villalba, *et al.* 2011), se pudieron identificar señales características para oxido de silicio  $\text{SiO}_2$  con sistema primitivo hexagonal, según las coordenadas  $2\theta = 20,73^\circ; 26,59^\circ; 45,80^\circ; 50,10^\circ; 54,61^\circ$  y  $68,20^\circ$ , los cuales están reportados en el (PDF número 86-1630 de la base JCPDS).

**Tabla 4.** Resultados de los Análisis de A.A. realizados a las cales hidráulicas obtenidas de las dos especies.

Muestra	% Calcio (Ca)	% Aluminio (Al)	% Hierro (Fe)
Cal Hidráulica obtenida de la <i>Crassostrea Rizophorae</i>	$53,1 \pm 2,0$	$0,3 \pm 0,4$	$1,85 \pm 0,20$
Cal Hidráulica obtenida de la <i>Pinctada Radiata</i>	$51,2 \pm 1,2$	$0,5 \pm 0,2$	$2,21 \pm 0,10$

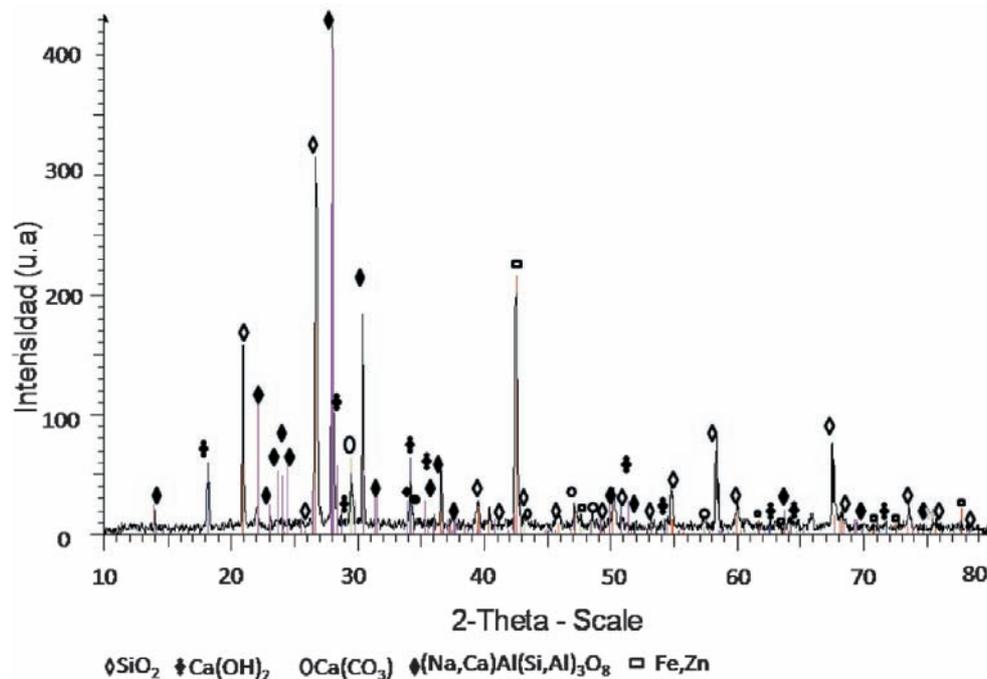


Figura 10. Patrón de difracción de rayos X del mortero con composición 1:2 de cal de la mezcla 75% de la especie *Pinctada Radiata* y 50% de *Crassostrea Rizophorae* y arena.

Se apreció que la utilización de conchas meteorizadas de bivalvos, calcinadas son una fuente de cal viva, que con la adición de agua y arena, conduce a la formación de portlandita fase fundamental, para la consolidación de piedra coralina arrecifal de naturaleza carbonática, presente en monumentos antiguos, aumentando se resistencia al deterioro.

Se obtuvo cal hidráulica y se logró su transformación, evidenciando la presencia de fases cristalinas como el aluminio silicato de sodio y calcio, dichas fases, podrían aumentar el grado de cohesión del mortero pañete a la roca. (Gomez-Villalba, *et al.* 2011). (Lewin, 1981).

### Conclusiones

A partir de este estudio se obtuvo cal procedente de los materiales marinos meteorizados, que fue óptima para la fabricación de morteros tipo pañete para restauración, debido a los porcentajes altos de calcio que poseían, siendo una fuente promisoría de  $\text{CaCO}_3$  para la obtención de cal hidráulica y ser empleadas en restauración de material pétreo de edificaciones antiguas. Esto sumado a que por poseer superficie específica bajas y microporosidad alta, son poco adsorbentes y menos propensos a los ataques de microorganismos y absorción de contaminantes atmosféricos.

### Agradecimiento

Quisiéramos manifestar nuestro profundo reconocimiento al Instituto de Mejoras Públicas de Cartagena, por todas las facilidades que brindó para la preparación de este trabajo. Al MSc en química Albeiro Hernández por su valiosa colaboración en los análisis térmicos. A los curadores de la escuela Taller Cartagena de Indias (AECI), Lucía Carmona, agradece al doctor Alfonso Devia (QPD), Vicente Benavides y Rogelio Ospina, Laboratorio de DRX y SEM del Laboratorio de Física de Plasma por su grata colaboración en el centro de excelencia de materiales Universidad Nacional sede Manizales, durante su pasantía de investigación. A la Vicerrectoría de Investigaciones Unicartagena por el proyecto sostenibilidad de grupos 2009-2010.

### Bibliografía

- Al-Madfa, H. Abdel-Moati, M.A. & Al-Gimaly, F.H. 1998. *Pinctada radiata* (pearl oyster): A biondicator for metal pollution Monitoring in the Qatari Waters (Arabian Gulf) *Bull Environ Contam Toxicol* 60:245-251.
- Ashurst, J. 1983. *Mortars, Plasters and Renders in Conservation Ecclesiastical Architect's and Surveyors Association*, J. Ashurst: Books. Riba Publications London.

- Asociación Colombiana de Productores de Cemento.** 1981. Normas Técnicas Colombianas para el cemento, Segunda edición. Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC.
- \_\_\_\_\_. 2004. Determinación de la resistencia de morteros de cemento hidráulico usando cubos de 50 mm o 50.8 mm de lado. Bogotá: ICONTEC 11: (693.5 NTC 220).
- Barbosa, A.L. & Buendía, C.** 2007. Estudio fisicoquímico del deterioro del material pétreo estructural antiguo de las murallas de Cartagena de Indias-Colombia (Baluarte de Santiago). *Revista Ciencias e Ingenierías al Día*. 1:101-107.
- \_\_\_\_\_. **Buendía, C., Muñoz, R. & Cortez, L.E.** 2007a. Determinación del grado de deterioro fisicoquímico de la muralla de Cartagena baluarte de Santiago, Congreso de Materiales, Cartagena, II Congreso Internacional de materiales y VII Congreso Nacional de Corrosión y Protección, UIS Universidad Industrial de Santander.
- Beck, M.B., Brumbaugh, R.D., Airoidi, L., Carranza, A., Coen, L.D., Crawford, C., Defeo, O. Edgar, G.J., Hancock, B., Kay, M., Lenihan, H., Luckenbach, M.W., Toropova C.L & Zhang, G.** 2009. Shellfish Reefs at Risk: A Global Analysis of Problems and Solutions. The Nature Conservancy, Arlington VA.
- Buitrago, E. & Alvarado, D.** 2005. Highly efficient oyster spat collector made with recycled materials 33(1):63-72.
- Carmona L., Buendía, C., Barbosa A.L., Muñoz R., España,W., Acevedo. C., Hernández A., & Carmona, D.** 2005. Desarrollo de morteros de restauración a partir de material marino meteorizado presentes en San Antero -Córdoba y Bocachica – Cartagena de Indias – Colombia, III Congreso Internacional de Materiales - CIM 2005 y Simposio Materia.
- Carranza, A., Defeo, O & Beck. M.W.** 2009a. Diversity, conservation status and threats for native oysters (Ostreidae) in the Atlantic and Caribbean coasts of South America Aquatic Conservation 19:344-353.
- De Freitas, M., Reboucas, do M. C., Amaral, W. & Pfeiffer, C.** 2003. High Zn and Cd accumulation in the oyster *Crassostrea rhizophorae*, and its relevance as a sentinel species. *Marine Pollution Bulletin* 46:1341-1358.
- Caliskan, S.** 2003. Aggregate/mortar interface: influence of silica fume at the micro- and macro-level Cement and Concrete Composites 25(4-5):557-564.
- Gárate I.** 1999. Artes de la Cal, cuarta edición, Editorial Munilla-leria España.
- García-Heras, M., Reyes, J., Trujeque, R., Ruiz-Guzmán, M.A., Avilés -Esaño, A., Ruiz Conde, N & Sánchez Soto P.J.** 2006. Estudio arqueométrico de figurillas cerámicas mayas de Calakmul (Campeche, México) *Bol Soc Esp Ceram V* 45(4):245-254.
- Gómez-Vilalba L.S., López-Arce P., Zornoza, A., Álvarez de Buergo, M & Fort, R.** 2011. Evaluación del tratamiento de consolidación de dolomías mediante nanopartículas de hidróxido de calcio en condiciones de alta humedad relativa. *Bol Soc Esp Ceram Vidr* 50(2):85-92.
- Herrera L.K. & Arroyave C.** 2002. Protección y Prevención del Biodeterioro de Materiales Estructurales del Patrimonio Cultural Colombiano. Iglesia La Veracruz en Medellín. En: Memorias de las Jornadas sobre Prevención y Protección del Patrimonio Cultural Iberoamericano de los Efectos del Biodeterioro Ambiental (Ed. Moya S.A) CYTED, 155-169, Medellín.
- Izaguirre A., Lanab J & Álvarez J.I.** 1993. Characterization of aerial lime-based mortars modified by the addition of two different water-retaining agents Cement and Concrete Composites 15(1-2):75-84.
- \_\_\_\_\_. **Lanab J & Álvarez J.I.** 2009. Effect of water-repellent mixtures on the behavior of aerial lime-based mortars. *Cement and Concrete Research* 39(11):1095-1104.
- Karatasios, I., Katsiotisa, M., Likodimos, V., Kontos, A. I., Papavassiliou, G., Falaras P., & Kilikoglou V.** 2006. Photo-induced carbonation of lime-TiO<sub>2</sub> mortars. *Applied Surface Science* 252(23):8077-8085.
- \_\_\_\_\_. **Kilikoglou, V., Colston, B., Theoulakis & P., Watt, D.** 2010. Setting process of lime-based conservation mortars with barium hydroxide, *Applied Catalysis B: Environmental* 95(1-2):78-86.
- Lacerda, L.D., Pfeiffer, W.C & Fiszman, M.** 1987. Heavy metal distribution, fate and availability in Sepetiba Bay, SE Brazil. *Science of the Total Environment* 65:163-173.
- Lewin, S.Z.** 1981. X-Ray Difracción and Scanning Electron Microscope Analysis of Conventional Mortars. In: Mortars, Cements and Grouts used in the Conservation of Historic Buildings. Symposium 3-6.11, Roma.
- Leuzzi, G. & Monti, P.** 1998. Particle trajectory simulation of dispersion around a building. *Atmospheric Environment* 32(2):203-214.
- López-Arce, P., Gomez-Villalba, L.S. Pinho, L. Fernández-Valle, M. E. Álvarez de Buergo, M & Fort, R.** 2010. Influence of porosity and relative humidity on consolidation of dolostone with calcium hydroxide nanoparticles: Effectiveness assessment with non-destructive techniques. *Mat Character* 61(2):168-184.
- Macedo, M. F., Miller, A. Z., Dionísio, A & Saiz-Jimenez, C.** 2009. Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview *Microbiology* 155:3476-3490.
- Milano, J., D'Armas, H & Maza, A.** 2005. Estudio de Lípidos, Proteínas y Glucógeno de *Crassostrea rhizophorae* provenientes de caroni swamp y las lagunas de Chacopata y la Restinga. *Saber Universidad de Oriente, Venezuela* 17(2):110-117.
- Pérez, A.M.** 1990. Ensayos y experiencias de alteración en la Conservación de Obras de Piedra de Interés Histórico, Artístico, Fundación Ramón Areces, Capítulo 9, Madrid.
- Pérez, M & Baltaille, M.** 2005. Las rocas en la construcción monumental: Su deterioro y técnicas de intervención. Parte I. Deterioro. Área de rocas y minerales industriales. Instituto Geológico y Minero de España (IGME). Madrid.
- Saiz-Jiménez, C & Ariño, X.** 2008. Colonización Biológica y Deterioro de Morteros por organismos fotótrofos, Sevilla-España Red Temática del CSIC de Patrimonio Histórico y Cultural Novena Reunión Avances Recientes en la Investigación sobre Patrimonio Sevilla.

**Useche, L.A.** 1993. Estudio de Morteros y Pañetes Antiguos para la Conservación de Monumentos Históricos (Tesis para la obtención del título de Master en Ciencias Químicas), Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Química. Bogotá, Colombia.

\_\_\_\_\_, 1990. Estudio de Consolidación del Portalón de Santo Domingo en Popayán, Colombia. Preprints of the Contribution to the International Meeting Lavas and Volcanic Tuffs, Easter Island, Chile, 229.

**Videla, H.A.** 2003. Procesos de Biodeterioro, Biocorrosión e Intemperismo En El Deterioro Del Patrimonio Cultural. Similitudes y Diferencias. En: Memorias de las Jornadas sobre Prevención y Protección del Patrimonio Cultural Iberoamericano de los Efectos del Biodeterioro Ambiental. Ed. H.A. Videla, RT XV-E Cytod, 25-34, Cartagena.

Recibido: julio 16 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.

# STUDY OF SOME VOLUMETRIC PROPERTIES OF GLYCEROL FORMAL + ETHANOL MIXTURES AND CORRELATION WITH THE JOUYBAN-ACREE MODEL

Andrés R. Holguín<sup>1</sup>, Daniel R. Delgado<sup>1</sup>, Fleming Martínez<sup>1\*</sup>, Mehri Khoubnasabjafari<sup>2</sup>, Abolghasem Jouyban<sup>3</sup>

## Abstract

**Holguín, A. R., D. R. Delgado, F. Martínez, M. Khoubnasabjafari, A. Jouyban.** Study of some volumetric properties of glycerol formal + ethanol mixtures and correlation with the Jouyban-acree model. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **35** (136): 315-328, 2011. ISSN 0370-3908.

Molar volumes, excess molar volumes, and partial molar volumes were investigated for glycerol formal + ethanol mixtures by density measurements at several temperatures. Excess molar volumes are fitted by Redlich-Kister equation and compared with other systems. The system exhibits negative excess volumes probably due to increased H-bond interactions. Volume thermal expansion coefficients are also calculated. The Jouyban-Acree model was used for density and molar volume correlations at different temperatures. The mean relative deviations between experimental and calculated data were  $0.03 \pm 0.03\%$  and  $0.17 \pm 0.13\%$ , respectively for density and molar volume data. Also, using a minimum number of data points, the Jouyban-Acree model can predict density and molar volume with acceptable accuracies ( $0.03 \pm 0.03\%$  and  $0.15 \pm 0.12\%$ , respectively).

**Key words:** glycerol formal; ethanol; binary liquid mixtures; excess volumes; partial volumes; Jouyban-Acree model.

## Resumen

En este trabajo se calculan los volúmenes molares, molares de exceso y molares parciales a partir de valores de densidad para el sistema glicerol formal + etanol en todo el intervalo de composición a temperaturas entre 278,15 y 313,15 K. Los volúmenes molares de exceso se modelaron de acuerdo a la ecuación de Redlich-Kister y se compararon con los reportados para otros sistemas. El sistema estudiado presenta volúmenes de exceso negativos probablemente debido a

<sup>1</sup> Grupo de Investigaciones Farmacéutico-Físicoquímicas, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, D.C., Colombia.

\* Correspondence: E-mail: fmartinezr@unal.edu.co

<sup>2</sup> Tuberculosis and Lung Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

<sup>3</sup> Drug Applied Research Center and Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

fuertes interacciones por unión de hidrógeno. También se analizó el efecto de la temperatura sobre las diferentes propiedades volumétricas estudiadas. Así mismo se calcularon los coeficientes térmicos de expansión volumétrica. Finalmente se usó el modelo Jouyban-Acree para correlacionar la densidad y el volumen molar de las diferentes mezclas encontrando desviaciones medias relativas de  $0,03 \pm 0,03\%$  y  $0,17 \pm 0,13\%$  para densidades y volúmenes molares respectivamente.

**Palabras clave:** glicerol formal; etanol; mezclas líquidas binarias; volúmenes de exceso; modelo de Jouyban-Acree.

## Introduction

Non-aqueous solvent mixtures have sometimes been used in human and veterinarian pharmacy in order to increase the solubility of drugs poorly soluble in water during the design of injectable homogeneous dosage forms (Rubino, J.T., 1988). Ethanol and propylene glycol are the cosolvents most used in design nowadays and sometimes have been employed blended (Yalkowsky, S.H., 1999). Glycerol formal is a non-toxic and environmentally-friendly organic solvent (Budavari, S. *et al.* 2001), miscible with water, ethanol and propylene glycol in all possible compositions and has been widely used as cosolvent for veterinarian formulations such as those containing the antinematodal drug, ivermectin (Lo, P.K.A. *et al.* 1985; DiPietro, J.A. *et al.* 1986; Reinemeyer, C.R. & Courtney, C.H., 2001). Glycerol formal is available as the mixture of 5-hydroxy-1,3-dioxane and 4-hydroxymethyl-1,3-dioxolane (60:40) and as the individual isomers (Budavari, S. *et al.* 2001; Pivnichny, J.V., 1984).

The mixtures obtained using these cosolvents are non-ideal due to increased interactions between unlike molecules and differences in molar volumes of pure components, which leads to non-additive volumes on mixing (Battino, R., 1971; Kapadi, U.R. *et al.* 2001). For this reason it is necessary to characterize the volumetric behavior of these binary mixtures as a function of composition and temperature in order to extend the physicochemical information available for liquid mixtures used in pharmacy. This information is useful to represent the intermolecular interactions present in liquid pharmaceutical systems and to facilitate the processes of medicines design at industrial level (Jiménez, J. *et al.* 2004).

In this report, the excess molar volumes and the partial molar volumes of the binary system of glycerol formal + ethanol at various temperatures as well as other volumetric properties are reported. The physicochemical properties reported here were calculated according to several mathematical procedures widely exposed in the literature (Wahab, M.A. *et al.* 2002; Salas, J.A. *et al.* 2002; Peralta, R.D. *et al.* 2003; Resa, J.M. *et al.* 2004). This work is a

continuation of those presented previously about some volumetric properties of glycerol formal + water mixtures (Delgado, D.R. *et al.* 2011) and glycerol formal + propylene glycol mixtures (Rodríguez, G.A. *et al.* 2011).

## Experimental

### Materials

In this investigation glycerol formal (5-hydroxy-1,3-dioxane isomer) from Lambiotte & Cie S.A. was employed and is in agreement with the quality requirements indicated for veterinarian medicinal products. Density and refractive index of glycerol formal ( $\rho = 1.2214 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  and  $n_D = 1.4535$  at 298.15 K, respectively) were in good agreement with the values reported for the single 5-hydroxy-1,3-dioxane isomer ( $\rho_4^{25} = 1.2200 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  and  $n_D^{25} = 1.4527$ ) (Budavari, S. *et al.* 2001). Figure 1 shows the molecular structure of 5-hydroxy-1,3-dioxane isomer. In the same way, dehydrated ethanol A.R. (Merck, Germany) was also used and is in agreement with the quality requirements indicated for medicinal products indicated in the American Pharmacopeia USP (US Pharmacopeia, 1994). The dehydrated glycerol formal and ethanol employed were maintained over molecular sieve to obtain dry solvents prior to prepare the solvent mixtures.

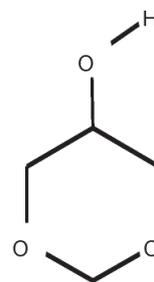


Figure 1. Molecular structure of glycerol formal (5-hydroxy-1,3-dioxane isomer).

### Cosolvent mixtures preparation

All glycerol formal + ethanol mixtures were prepared in quantities of 40.00 g by mass using a Ohaus Pioneer TM PA214 analytical balance with sensitivity  $\pm 0.1 \text{ mg}$ , in

concentrations from 0.05 to 0.95 in mass fraction (varying in 0.05) of glycerol formal, to study 19 mixtures and the two pure solvents. This procedure implies an uncertainty of  $\pm 2 \times 10^{-5}$  in mole fraction. The mixtures were allowed to stand in Magni Whirl Blue M or Neslab RTE 10 Digital Plus (Thermo Electron Company) water baths at temperatures from 278.15 K to 313.15 K varying in  $5.00 \pm 0.05$  K for at least 30 minutes prior to density determinations.

### Density determination

This property was determined using a DMA 45 Anton Paar digital density meter connected to a Neslab RTE 10 Digital Plus (Thermo Electron Company) recirculating thermostatic water bath according to a procedure previously described (Martínez, F. *et al.* 2002). The equipment was calibrated according to Instruction Manual using air and water at the different temperatures studied (Kratky, O. *et al.* 1980). From density values, all thermodynamic properties were calculated as will be indicate in the next section.

### Results and discussion

In order to define the solvents 1 and 2 in the binary mixtures according to polarity the Hildebrand solubility parameter ( $\delta$ ) of glycerol formal was calculated as 24.8 MPa<sup>1/2</sup> according to procedures described by Barton, A.F.M. (1991), which are presented in Table 1. Accordingly, glycerol formal is a solvent less polar compared with ethanol ( $\delta$  value is 26.5 MPa<sup>1/2</sup>, Barton, A.F.M., 1991).

In Table 2 the composition of glycerol formal + ethanol, in mass ( $\mu_{GF}$ ) and mole ( $x_{GF}$ ) fraction, in addition to studied

density values at several temperatures, is presented. Figure 2 plotted experimental density data against fraction of glycerol formal and temperature.

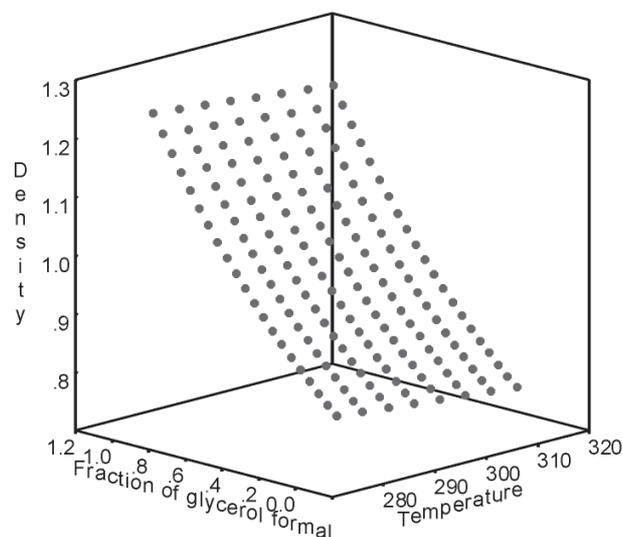


Figure 2. Experimental density values ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) in mixtures of glycerol formal + ethanol at different temperatures (K).

In the literature no values are available for this binary solvent system and therefore no direct comparison is possible. Nevertheless, it is important to remember that Pineda, L.M. *et al.* (2003) and Arias, L.J. *et al.* (2004) reported density values at 298.15 K for binary mixtures obtained employing material raw without any dehydration process, just as they are used in the pharmaceutical industries. Accordingly, the cosolvents studied by these authors had

Table 1. Hansen partial solubility parameters and total solubility parameter of glycerol formal (5-hydroxy-1,3-dioxane isomer).

Group or atom	Group Number	Van Krevelen		
		$F_d / \text{J}^{1/2} \text{cm}^{3/2} \text{mol}^{-1 a}$	$F_p^2 / \text{J cm}^3 \text{mol}^{-2 a}$	$U_h / \text{J mol}^{-1 a}$
-OH	1	$1 \times 210$	$1 \times (500)^2$	$1 \times 20000$
-O-	2	$2 \times 100$	$2 \times (400)^2$	$2 \times 3000$
-CH <sub>2</sub> -	3	$3 \times 270$	$3 \times (0)^2$	$3 \times 0$
>CH-	1	$1 \times 80$	$1 \times (0)^2$	$1 \times 0$
		1300	570000	26000
		$\delta_d = (1300/85.23)$ $= 15.25 \text{ MPa}^{1/2 b}$	$\delta_p = ((570000)^{1/2}/85.23)$ $= 8.86 \text{ MPa}^{1/2 c}$	$\delta_h = (26000/85.23)^{1/2}$ $= 14.47 \text{ MPa}^{1/2 d}$
		$\delta_r^e = (15.25^2 + 8.86^2 + 14.47^2)^{1/2} = 24.82 \text{ MPa}^{1/2}$		

<sup>a</sup> Calculated from values and procedures described by Barton, A.F.M. (1991).

<sup>b</sup> Dispersion parameter.

<sup>c</sup> Dipolar parameter.

<sup>d</sup> Hydrogen-bonding parameter.

<sup>e</sup> Total solubility parameter.

some low quantities of water, i.e. 0.31 % m/m and 6.52% m/m for glycerol formal and ethanol, respectively. Table 2 shows that in all cases the density increases as the glycerol formal proportion increases in the mixtures and it decreases linearly as the temperature increases. In the other hand, density values decrease as the ethanol proportion increases in the mixtures following concave parabolic trends

### Molar volumes and excess molar volumes

In Table 3 the molar volumes ( $V^0$ ) for binary mixtures at all studied temperatures are presented which were calculated from Equation (1).

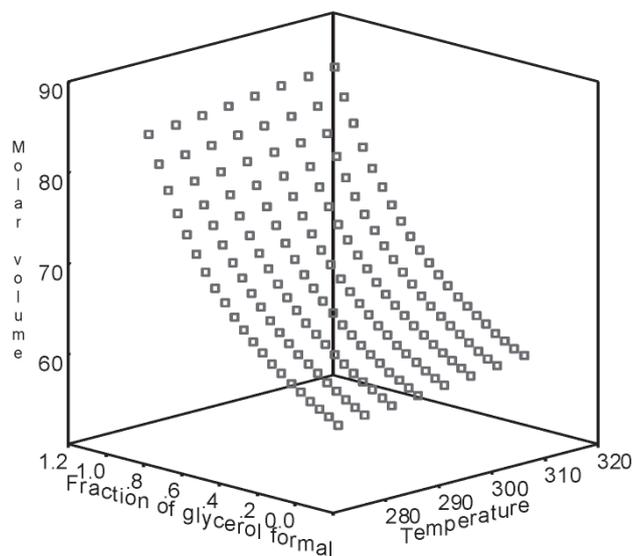
$$V^0 = \frac{x_1 M_1 + x_2 M_2}{\rho} \quad (1)$$

**Table 2.** Densities  $^{a, b}$  for glycerol formal + ethanol mixtures at various temperatures

Glycerol formal		Temperature / K							
$\mu_{GF}$	$x_{GF}$	278.15		283.15		288.15		293.15	
		Exp.	Cal.	Exp.	Cal.	Exp.	Cal.	Exp.	Cal.
0.0000	0.0000	0.8035	0.8035	0.7990	0.7990	0.7946	0.7946	0.7895	0.7895
0.0500	0.0228	0.8174	0.8182	0.8132	0.8138	0.8089	0.8095	0.8047	0.8044
0.1000	0.0469	0.8331	0.8336	0.8286	0.8292	0.8246	0.8249	0.8202	0.8199
0.1500	0.0724	0.8494	0.8495	0.8449	0.8451	0.8408	0.8409	0.8364	0.8360
0.2000	0.0996	0.8661	0.8660	0.8616	0.8617	0.8574	0.8575	0.8531	0.8526
0.2500	0.1285	0.8832	0.8832	0.8789	0.8789	0.8747	0.8748	0.8704	0.8700
0.3000	0.1594	0.9011	0.9011	0.8968	0.8968	0.8925	0.8927	0.8882	0.8879
0.3500	0.1924	0.9197	0.9196	0.9156	0.9154	0.9112	0.9113	0.9069	0.9066
0.4000	0.2278	0.9395	0.9389	0.9352	0.9347	0.9308	0.9307	0.9264	0.9260
0.4500	0.2658	0.9596	0.9589	0.9552	0.9548	0.9509	0.9508	0.9464	0.9461
0.5000	0.3068	0.9803	0.9798	0.9760	0.9756	0.9716	0.9716	0.9672	0.9670
0.5500	0.3510	1.0019	1.0014	0.9976	0.9972	0.9932	0.9933	0.9889	0.9887
0.6000	0.3990	1.0243	1.0239	1.0199	1.0197	1.0156	1.0158	1.0114	1.0112
0.6500	0.4511	1.0476	1.0473	1.0433	1.0431	1.0389	1.0392	1.0346	1.0346
0.7000	0.5080	1.0722	1.0716	1.0680	1.0674	1.0636	1.0635	1.0592	1.0590
0.7500	0.5704	1.0973	1.0969	1.0930	1.0927	1.0887	1.0888	1.0841	1.0842
0.8000	0.6390	1.1236	1.1232	1.1192	1.1189	1.1147	1.1150	1.1104	1.1105
0.8500	0.7149	1.1511	1.1505	1.1472	1.1463	1.1428	1.1423	1.1382	1.1378
0.9000	0.7993	1.1796	1.1789	1.1751	1.1746	1.1710	1.1707	1.1664	1.1661
0.9500	0.8937	1.2092	1.2085	1.2049	1.2042	1.2002	1.2002	1.1957	1.1956
1.0000	1.0000	1.2393	1.2393	1.2349	1.2349	1.2309	1.2309	1.2263	1.2263
$\mu_{GF}$	$x_{GF}$	298.15		303.15		308.15		313.15	
		Exp.	Cal.	Exp.	Cal.	Exp.	Cal.	Exp.	Cal.
0.0000	0.0000	0.7853	0.7853	0.7811	0.7811	0.7767	0.7767	0.7720	0.7720
0.0500	0.0228	0.8004	0.8002	0.7961	0.7961	0.7918	0.7917	0.7875	0.7870
0.1000	0.0469	0.8158	0.8157	0.8117	0.8116	0.8071	0.8073	0.8027	0.8026
0.1500	0.0724	0.8321	0.8318	0.8278	0.8277	0.8233	0.8234	0.8190	0.8188
0.2000	0.0996	0.8487	0.8485	0.8444	0.8444	0.8401	0.8402	0.8354	0.8356
0.2500	0.1285	0.8660	0.8658	0.8617	0.8617	0.8573	0.8576	0.8528	0.8530
0.3000	0.1594	0.8839	0.8838	0.8798	0.8797	0.8753	0.8756	0.8709	0.8710
0.3500	0.1924	0.9025	0.9024	0.8982	0.8983	0.8944	0.8943	0.8896	0.8897
0.4000	0.2278	0.9219	0.9218	0.9176	0.9177	0.9131	0.9137	0.9089	0.9091
0.4500	0.2658	0.9419	0.9419	0.9376	0.9378	0.9331	0.9339	0.9288	0.9293
0.5000	0.3068	0.9628	0.9628	0.9583	0.9586	0.9539	0.9547	0.9496	0.9501
0.5500	0.3510	0.9843	0.9844	0.9799	0.9803	0.9755	0.9764	0.9714	0.9718
0.6000	0.3990	1.0069	1.0069	1.0023	1.0027	0.9980	0.9989	0.9941	0.9943
0.6500	0.4511	1.0300	1.0303	1.0255	1.0261	1.0213	1.0223	1.0167	1.0176
0.7000	0.5080	1.0546	1.0546	1.0501	1.0503	1.0458	1.0466	1.0420	1.0419
0.7500	0.5704	1.0796	1.0798	1.0751	1.0754	1.0706	1.0718	1.0665	1.0670
0.8000	0.6390	1.1060	1.1060	1.1014	1.1016	1.0972	1.0979	1.0932	1.0932
0.8500	0.7149	1.1338	1.1332	1.1295	1.1287	1.1250	1.1251	1.1214	1.1203
0.9000	0.7993	1.1616	1.1615	1.1575	1.1569	1.1539	1.1533	1.1490	1.1484
0.9500	0.8937	1.1913	1.1908	1.1868	1.1862	1.1822	1.1826	1.1778	1.1777
1.0000	1.0000	1.2214	1.2214	1.2167	1.2167	1.2131	1.2131	1.2081	1.2081

<sup>a</sup> Unit: g.cm<sup>-3</sup>. <sup>b</sup> The mean standard deviation was 0.0001 g.cm<sup>-3</sup>

where  $M_1$  and  $M_2$  are the molar masses, for both components respectively ( $104.10 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  for glycerol formal and  $46.07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  for ethanol, **Budavari, S. et al.** 2001),  $x_1$  and  $x_2$  are the respective mole fraction of components, and  $\rho$  is the mixture density. Figure 3 shows the molar volume as a function of mixtures composition and temperature.

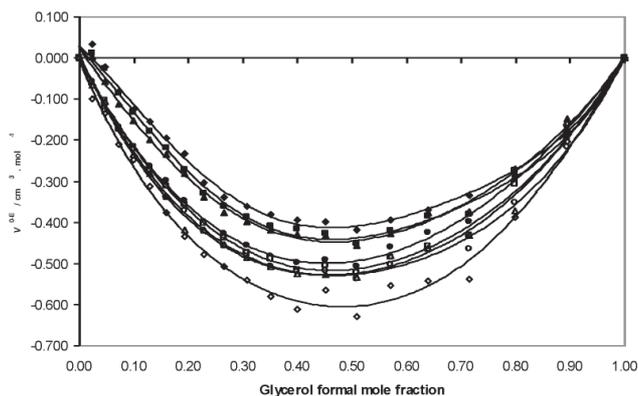


**Figure 3.** Experimental molar volumes ( $\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ ) in mixtures of glycerol formal + ethanol at different temperatures (K).

On the other hand, the excess molar volumes ( $V^{0-E}$ ) calculated from Equation (2) (where,  $\rho_1$  and  $\rho_2$  are the densities of pure components) at all studied temperatures, are also presented in Table 3. This behavior is shown graphically in Figure 4 at all studied temperatures.

$$V^{0-E} = \frac{x_1 M_1 + x_2 M_2}{\rho} - \left( \frac{x_1 M_1}{\rho_1} + \frac{x_2 M_2}{\rho_2} \right) \quad (2)$$

In similar way to the behavior obtained in other similar investigations developed in our research group with other solvent systems (**Jiménez, J. et al.** 2004; **Jiménez, J. & Martínez, F.** 2005, 2006; **Ruidiaz, M.A. & Martínez, F.** 2009; **Rodríguez, S.J. et al.** 2010), in almost all cases the excess volumes are negative (especially around 0.60-0.70 in mole fraction of glycerol formal, where it is approximately equal to  $-0.60 \text{ cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  at 313.15 K) indicating contraction in volume, except at 278.15 and 283.15 K in the mixture with composition 0.05 in mass fraction of glycerol formal where positive values near to  $0.03 \text{ cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  were obtained. It is interesting to note that glycerol formal + water mixtures



**Figure 4.** Excess molar volumes of glycerol formal + ethanol mixtures at several temperatures. ( $\blacklozenge$ ): 278.15 K; ( $\blacksquare$ ): 283.15 K; ( $\blacktriangle$ ): 288.15 K; ( $\bullet$ ): 293.15 K; ( $\square$ ): 298.15 K; ( $\circ$ ): 303.15 K; ( $\triangle$ ): 308.15 K; ( $\diamond$ ): 313.15 K.

exhibited negative excess volumes (**Delgado, D.R. et al.** 2011) whereas glycerol formal + propylene glycol exhibited positive excess volumes (**Rodríguez, G.A. et al.** 2011).

As was already said (**Jiménez, J & Martínez, F.**, 2005, 2006; **Delgado, D.R. et al.** 2011), according to **Fort, R.T. & Moore, W.R.** (1966), a negative excess volume is an indication of strong heteromolecular interactions in the liquid mixtures and is attributed to charge transfer, dipole-dipole, dipole-induced dipole interactions, and hydrogen bonding between the unlike components, while a positive sign indicates a weak interaction and is attributed to dispersion forces (London interactions) which are likely to be operative in every cases.

In the evaluated system, where the hydrogen bonding predominates, the contraction in volume has been interpreted basically in qualitative terms considering the following events: first: expansion due to depolymerization of glycerol formal and ethanol by one another, second: contraction due to free volume difference of unlike molecules, and third: contraction due to hydrogen bond formation between glycerol formal and ethanol through  $-\text{OH}\cdots\text{O}<$  or  $-\text{OH}\cdots\text{OH}$  bonding.

Thus, the large negative values of  $V^{0-E}$  over the free volume contribution indicate the presence of strong specific interactions with predominance of formation of hydrogen bonds between glycerol formal and ethanol over the rupture of hydrogen bonding in ethanol-ethanol and water-water.

The excess molar volumes become more positive as the temperature although this result is not clear at molecular level.

**Table 3.** Experimental and calculated molar volumes, excess molar volumes, and partial molar volumes of components for glycerol formal + ethanol mixtures at various temperatures.

T / K	Glycerol formal		$V^{0\ a,b}$		$V^{0-E\ a,b}$	$\left(\frac{\partial V}{\partial \mu_{GF}}\right)^a$	$\bar{V}_{GF}^0\ a,b$	$\bar{V}_{EtOH}^0\ a,b$
	$\mu_{GF}$	$x_{GF}$	Exp.	Cal.				
278.15	0.0000	0.0000	57.34	57.34	0.000	-0.4633	81.33	57.34
	0.0500	0.0228	57.98	57.86	0.034	-0.4610	81.77	57.42
	0.1000	0.0469	58.56	58.43	-0.022	-0.4587	81.99	57.41
	0.1500	0.0724	59.19	59.05	-0.081	-0.4564	82.18	57.39
	0.2000	0.0996	59.87	59.71	-0.126	-0.4540	82.39	57.38
	0.2500	0.1285	60.61	60.42	-0.155	-0.4517	82.60	57.37
	0.3000	0.1594	61.39	61.18	-0.194	-0.4494	82.78	57.34
	0.3500	0.1924	62.24	62.00	-0.233	-0.4471	82.94	57.30
	0.4000	0.2278	63.11	62.89	-0.302	-0.4447	83.03	57.23
	0.4500	0.2658	64.09	63.84	-0.339	-0.4424	83.16	57.18
	0.5000	0.3068	65.16	64.89	-0.360	-0.4401	83.29	57.13
	0.5500	0.3510	66.32	66.02	-0.382	-0.4378	83.40	57.08
	0.6000	0.3990	67.58	67.27	-0.394	-0.4355	83.50	57.01
	0.6500	0.4511	68.97	68.65	-0.399	-0.4331	83.59	56.95
	0.7000	0.5080	70.46	70.17	-0.419	-0.4308	83.64	56.86
	0.7500	0.5704	72.15	71.86	-0.395	-0.4285	83.72	56.79
	0.8000	0.6390	74.01	73.75	-0.369	-0.4262	83.78	56.71
	0.8500	0.7149	76.07	75.87	-0.334	-0.4238	83.82	56.62
	0.9000	0.7993	78.38	78.26	-0.271	-0.4215	83.87	56.53
	0.9500	0.8937	80.99	80.95	-0.176	-0.4192	83.91	56.45
1.0000	1.0000	84.00	84.00	0.000	-0.4169	84.00	56.38	
283.15	0.0000	0.0000	57.66	57.66	0.000	-0.4690	81.47	57.66
	0.0500	0.0228	58.28	58.19	0.011	-0.4665	81.88	57.73
	0.1000	0.0469	58.88	58.77	-0.026	-0.4640	82.16	57.74
	0.1500	0.0724	59.50	59.39	-0.087	-0.4615	82.37	57.72
	0.2000	0.0996	60.18	60.06	-0.134	-0.4591	82.59	57.70
	0.2500	0.1285	60.91	60.77	-0.178	-0.4566	82.80	57.68
	0.3000	0.1594	61.69	61.54	-0.219	-0.4541	82.99	57.65
	0.3500	0.1924	62.51	62.36	-0.272	-0.4516	83.14	57.60
	0.4000	0.2278	63.40	63.25	-0.330	-0.4491	83.26	57.54
	0.4500	0.2658	64.38	64.22	-0.360	-0.4467	83.41	57.49
	0.5000	0.3068	65.44	65.26	-0.389	-0.4442	83.54	57.43
	0.5500	0.3510	66.60	66.40	-0.411	-0.4417	83.66	57.37
	0.6000	0.3990	67.87	67.65	-0.416	-0.4392	83.78	57.31
	0.6500	0.4511	69.25	69.03	-0.427	-0.4367	83.87	57.24
	0.7000	0.5080	70.74	70.55	-0.452	-0.4343	83.91	57.14
	0.7500	0.5704	72.43	72.23	-0.421	-0.4318	84.01	57.07
	0.8000	0.6390	74.30	74.12	-0.386	-0.4293	84.08	56.99
	0.8500	0.7149	76.32	76.23	-0.382	-0.4268	84.08	56.87
	0.9000	0.7993	78.68	78.60	-0.275	-0.4243	84.17	56.80
	0.9500	0.8937	81.28	81.27	-0.189	-0.4219	84.21	56.70
1.0000	1.0000	84.30	84.30	0.000	-0.4194	84.30	56.63	
288.15	0.0000	0.0000	57.98	57.98	0.000	-0.4734	81.73	57.98
	0.0500	0.0228	58.59	58.52	0.003	-0.4708	82.13	58.04
	0.1000	0.0469	59.17	59.10	-0.057	-0.4683	82.37	58.03
	0.1500	0.0724	59.79	59.73	-0.113	-0.4658	82.60	58.01
	0.2000	0.0996	60.47	60.40	-0.154	-0.4632	82.84	58.00
	0.2500	0.1285	61.20	61.12	-0.199	-0.4607	83.05	57.98
	0.3000	0.1594	61.99	61.89	-0.234	-0.4581	83.26	57.95
	0.3500	0.1924	62.82	62.72	-0.281	-0.4556	83.42	57.91
	0.4000	0.2278	63.70	63.61	-0.339	-0.4531	83.54	57.84
	0.4500	0.2658	64.67	64.58	-0.377	-0.4505	83.68	57.79
	0.5000	0.3068	65.74	65.63	-0.398	-0.4480	83.83	57.74
	0.5500	0.3510	66.90	66.77	-0.419	-0.4454	83.95	57.67
	0.6000	0.3990	68.16	68.02	-0.430	-0.4429	84.06	57.60
	0.6500	0.4511	69.54	69.39	-0.432	-0.4404	84.16	57.53
	0.7000	0.5080	71.03	70.91	-0.456	-0.4378	84.21	57.43
	0.7500	0.5704	72.72	72.59	-0.428	-0.4353	84.29	57.36
	0.8000	0.6390	74.60	74.46	-0.376	-0.4327	84.38	57.28

Continuation Table 3.

$T / K$	Glycerol formal		$V^{0\ a,b}$		$V^{0-E\ a,b}$	$\left(\frac{\partial V}{\partial \mu_{GF}}\right)_a$	$\bar{V}_{GF}^0\ a,b$	$\bar{V}_{EtOH}^0\ a,b$
	$\mu_{GF}$	$x_{GF}$	Exp.	Cal.				
293.15	0.8500	0.7149	76.62	76.56	-0.375	-0.4302	84.38	57.16
	0.9000	0.7993	78.96	78.92	-0.282	-0.4276	84.45	57.07
	0.9500	0.8937	81.60	81.57	-0.149	-0.4251	84.53	56.99
	1.0000	1.0000	84.58	84.58	0.000	-0.4226	84.58	56.90
	0.0000	0.0000	58.35	58.35	0.000	-0.4803	81.86	58.35
	0.0500	0.0228	58.89	58.89	-0.065	-0.4774	82.15	58.35
	0.1000	0.0469	59.49	59.48	-0.112	-0.4746	82.46	58.36
	0.1500	0.0724	60.11	60.11	-0.168	-0.4718	82.72	58.34
	0.2000	0.0996	60.78	60.79	-0.218	-0.4690	82.97	58.32
	0.2500	0.1285	61.50	61.51	-0.264	-0.4662	83.21	58.30
	0.3000	0.1594	62.29	62.29	-0.299	-0.4634	83.44	58.27
	0.3500	0.1924	63.11	63.12	-0.347	-0.4606	83.63	58.23
	0.4000	0.2278	64.00	64.01	-0.398	-0.4578	83.78	58.17
	0.4500	0.2658	64.98	64.98	-0.428	-0.4550	83.95	58.11
	0.5000	0.3068	66.04	66.03	-0.455	-0.4521	84.10	58.05
	0.5500	0.3510	67.19	67.17	-0.482	-0.4493	84.22	57.97
	0.6000	0.3990	68.44	68.42	-0.498	-0.4465	84.34	57.89
	0.6500	0.4511	69.83	69.79	-0.492	-0.4437	84.46	57.82
	0.7000	0.5080	71.33	71.30	-0.506	-0.4409	84.52	57.71
	0.7500	0.5704	73.03	72.98	-0.461	-0.4381	84.63	57.63
0.8000	0.6390	74.89	74.84	-0.426	-0.4353	84.69	57.53	
0.8500	0.7149	76.93	76.93	-0.399	-0.4325	84.71	57.41	
0.9000	0.7993	79.27	79.27	-0.299	-0.4296	84.78	57.31	
0.9500	0.8937	81.91	81.91	-0.165	-0.4268	84.84	57.21	
1.0000	1.0000	84.89	84.89	0.000	-0.4240	84.89	57.10	
298.15	0.0000	0.0000	58.67	58.67	0.000	-0.4848	82.10	58.67
	0.0500	0.0228	59.21	59.22	-0.061	-0.4819	82.41	58.67
	0.1000	0.0469	59.81	59.82	-0.104	-0.4790	82.73	58.68
	0.1500	0.0724	60.42	60.46	-0.172	-0.4761	82.98	58.66
	0.2000	0.0996	61.09	61.14	-0.217	-0.4732	83.25	58.64
	0.2500	0.1285	61.81	61.87	-0.268	-0.4704	83.49	58.62
	0.3000	0.1594	62.59	62.65	-0.313	-0.4675	83.71	58.58
	0.3500	0.1924	63.42	63.49	-0.357	-0.4646	83.91	58.54
	0.4000	0.2278	64.31	64.39	-0.404	-0.4617	84.08	58.48
	0.4500	0.2658	65.29	65.36	-0.438	-0.4588	84.25	58.42
	0.5000	0.3068	66.34	66.41	-0.474	-0.4559	84.39	58.35
	0.5500	0.3510	67.50	67.56	-0.490	-0.4531	84.54	58.28
	0.6000	0.3990	68.75	68.81	-0.516	-0.4502	84.64	58.20
	0.6500	0.4511	70.15	70.18	-0.505	-0.4473	84.77	58.12
	0.7000	0.5080	71.64	71.69	-0.522	-0.4444	84.84	58.02
	0.7500	0.5704	73.33	73.37	-0.485	-0.4415	84.94	57.93
	0.8000	0.6390	75.18	75.23	-0.458	-0.4386	84.99	57.82
	0.8500	0.7149	77.23	77.31	-0.433	-0.4358	85.01	57.70
	0.9000	0.7993	79.60	79.64	-0.307	-0.4329	85.12	57.61
	0.9500	0.8937	82.21	82.27	-0.200	-0.4300	85.15	57.49
1.0000	1.0000	85.23	85.23	0.000	-0.4271	85.23	57.40	
303.15	0.0000	0.0000	58.98	58.98	0.000	-0.4893	82.34	58.98
	0.0500	0.0228	59.53	59.54	-0.057	-0.4863	82.67	58.99
	0.1000	0.0469	60.11	60.14	-0.118	-0.4834	82.97	58.98
	0.1500	0.0724	60.73	60.79	-0.175	-0.4804	83.25	58.97
	0.2000	0.0996	61.41	61.48	-0.223	-0.4775	83.52	58.96
	0.2500	0.1285	62.12	62.21	-0.276	-0.4745	83.76	58.93
	0.3000	0.1594	62.88	63.00	-0.338	-0.4716	83.96	58.88
	0.3500	0.1924	63.73	63.85	-0.371	-0.4686	84.19	58.85
	0.4000	0.2278	64.62	64.75	-0.421	-0.4657	84.37	58.79
	0.4500	0.2658	65.59	65.73	-0.457	-0.4627	84.54	58.73
	0.5000	0.3068	66.65	66.79	-0.483	-0.4597	84.70	58.66

Continuation Table 3.

<i>T</i> / K	Glycerol formal		$V^{0\ a,b}$		$V^{0-E\ a,b}$	$\left(\frac{\partial V}{\partial \mu_{GF}}\right)^a$	$\bar{V}_{GF}^{0\ a,b}$	$\bar{V}_{EtOH}^{0\ a,b}$
	$\mu_{GF}$	$x_{GF}$	Exp.	Cal.				
	0.5500	0.3510	67.80	67.93	-0.508	-0.4568	84.84	58.59
	0.6000	0.3990	69.07	69.19	-0.521	-0.4538	84.97	58.51
	0.6500	0.4511	70.45	70.56	-0.519	-0.4509	85.09	58.43
	0.7000	0.5080	71.95	72.07	-0.537	-0.4479	85.15	58.32
	0.7500	0.5704	73.64	73.75	-0.502	-0.4450	85.25	58.23
	0.8000	0.6390	75.50	75.61	-0.468	-0.4420	85.32	58.12
	0.8500	0.7149	77.52	77.68	-0.464	-0.4391	85.31	57.98
	0.9000	0.7993	79.88	80.00	-0.351	-0.4361	85.40	57.88
	0.9500	0.8937	82.52	82.61	-0.217	-0.4332	85.46	57.78
	1.0000	1.0000	85.56	85.56	0.000	-0.4302	85.56	57.69
	0.0000	0.0000	59.32	59.32	0.000	-0.4946	82.54	59.32
	0.0500	0.0228	59.85	59.88	-0.066	-0.4916	82.86	59.32
	0.1000	0.0469	60.45	60.49	-0.106	-0.4886	83.21	59.33
	0.1500	0.0724	61.06	61.14	-0.171	-0.4855	83.48	59.31
	0.2000	0.0996	61.72	61.83	-0.235	-0.4825	83.74	59.28
	0.2500	0.1285	62.44	62.57	-0.281	-0.4795	84.00	59.26
	0.3000	0.1594	63.20	63.36	-0.337	-0.4764	84.22	59.22
	0.3500	0.1924	64.00	64.21	-0.419	-0.4734	84.36	59.14
	0.4000	0.2278	64.93	65.11	-0.419	-0.4703	84.63	59.12
	0.4500	0.2658	65.91	66.09	-0.454	-0.4673	84.81	59.06
308.15	0.5000	0.3068	66.96	67.15	-0.485	-0.4643	84.97	58.99
	0.5500	0.3510	68.11	68.29	-0.508	-0.4612	85.11	58.91
	0.6000	0.3990	69.36	69.54	-0.526	-0.4582	85.23	58.83
	0.6500	0.4511	70.74	70.91	-0.527	-0.4552	85.35	58.74
	0.7000	0.5080	72.24	72.42	-0.535	-0.4521	85.42	58.63
	0.7500	0.5704	73.95	74.09	-0.481	-0.4491	85.55	58.55
	0.8000	0.6390	75.79	75.94	-0.462	-0.4461	85.59	58.43
	0.8500	0.7149	77.83	78.00	-0.431	-0.4430	85.62	58.30
	0.9000	0.7993	80.13	80.31	-0.372	-0.4400	85.64	58.17
	0.9500	0.8937	82.84	82.90	-0.158	-0.4370	85.79	58.09
	1.0000	1.0000	85.82	85.82	0.000	-0.4339	85.82	57.97
	0.0000	0.0000	59.68	59.68	0.000	-0.5021	82.58	59.68
	0.0500	0.0228	60.18	60.25	-0.100	-0.4987	82.87	59.65
	0.1000	0.0469	60.78	60.86	-0.136	-0.4954	83.27	59.68
	0.1500	0.0724	61.38	61.52	-0.211	-0.4921	83.57	59.65
	0.2000	0.0996	62.07	62.21	-0.248	-0.4888	83.91	59.65
	0.2500	0.1285	62.77	62.96	-0.312	-0.4855	84.17	59.61
	0.3000	0.1594	63.52	63.75	-0.377	-0.4822	84.40	59.56
	0.3500	0.1924	64.34	64.60	-0.434	-0.4788	84.62	59.51
	0.4000	0.2278	65.23	65.51	-0.478	-0.4755	84.84	59.45
	0.4500	0.2658	66.21	66.49	-0.508	-0.4722	85.05	59.39
313.15	0.5000	0.3068	67.26	67.55	-0.541	-0.4689	85.22	59.32
	0.5500	0.3510	68.40	68.70	-0.579	-0.4656	85.36	59.22
	0.6000	0.3990	69.63	69.95	-0.612	-0.4622	85.47	59.12
	0.6500	0.4511	71.06	71.32	-0.566	-0.4589	85.67	59.06
	0.7000	0.5080	72.51	72.83	-0.629	-0.4556	85.68	58.91
	0.7500	0.5704	74.23	74.49	-0.554	-0.4523	85.84	58.82
	0.8000	0.6390	76.07	76.34	-0.542	-0.4490	85.88	58.69
	0.8500	0.7149	78.08	78.39	-0.538	-0.4456	85.88	58.53
	0.9000	0.7993	80.47	80.69	-0.387	-0.4423	86.00	58.44
	0.9500	0.8937	83.15	83.27	-0.204	-0.4390	86.10	58.33
	1.0000	1.0000	86.17	86.17	0.000	-0.4357	86.17	58.21

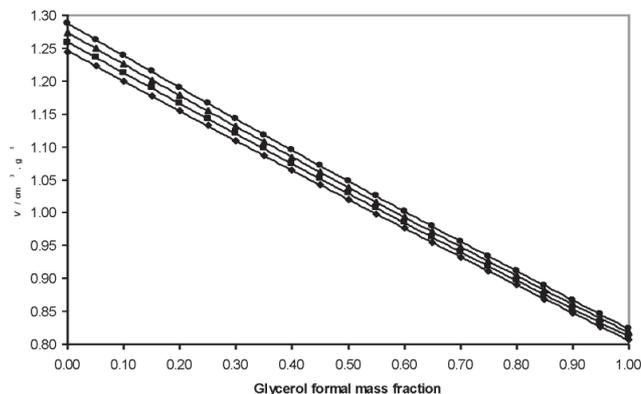
<sup>a</sup> Units:  $\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ . <sup>b</sup> The mean standard deviation for  $V^0$  and  $V^{0-E}$  was  $0.01\ \text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  while for  $\left(\frac{\partial V}{\partial \mu_{GF}}\right)^a$  and  $\bar{V}_{EtOH}^0$  and was close to  $0.03\ \text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$

### Partial molar volumes

The partial specific volumes of glycerol formal ( $\bar{V}_{\text{GF}}$ ) and ethanol ( $\bar{V}_{\text{EtOH}}$ ) were calculated using the classical Bakhuis-Roozeboom method by means of equations (3) and (4) applied to the variation of the respective specific volumes as a function of glycerol formal mass fraction (Reciprocal of densities reported in Table 3 and presented in Figure 5 at four temperatures) and adjusting them to second degree polynomials by least squares regression analyses (Kestin, J., 1979; Perrot, P., 1998). The first derivatives were taken out on the polynomials obtained and solved at each composition point.

$$\bar{V}_{\text{GF}} = V + \mu_{\text{EtOH}} \frac{dV}{d\mu_{\text{GF}}} \quad (3)$$

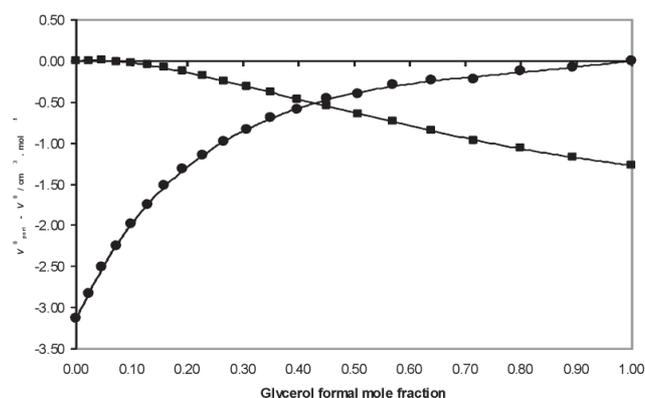
$$\bar{V}_{\text{EtOH}} = V - \mu_{\text{GF}} \frac{dV}{d\mu_{\text{GF}}} \quad (4)$$



**Figure 5.** Specific volume of glycerol formal + ethanol mixtures as a function of the mixtures composition at several temperatures. 278.15 K (◆), 288.15 K (■), 298.15 K (▲), 308.15 K (○).

The partial molar volumes were calculated from the respective partial specific volumes multiplied by the molar masses. The  $\bar{V}_{\text{GF}}^0$  and  $\bar{V}_{\text{EtOH}}^0$  values are also presented in Table 3 in addition to the slopes obtained ( $dV/d\mu_{\text{GF}}$ ) at each composition and temperature. In all cases the partial molar volumes of glycerol formal are lower than those obtained for the pure solvent at all temperatures. In the other hand, the partial molar volumes of ethanol are greater than those for the pure solvent in the mixtures where this cosolvent is in great proportion ( $0.00 < \mu_{\text{GF}} < 0.30$ ) but they are lower in the other mixtures ( $0.30 < \mu_{\text{GF}} < 1.00$ ). In cosolvent mixtures, the partial volumes for glycerol formal varied from  $81.77 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$  (for  $\mu_{\text{GF}} = 0.05$  at 278.15 K) to

$86.10 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$  (for  $\mu_{\text{GF}} = 0.95$  at 313.15 K), and for ethanol varied from  $56.45 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$  (for  $\mu_{\text{GF}} = 0.95$  at 278.15 K) to  $59.68 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$  (for  $\mu_{\text{GF}} = 0.10$  at 313.15 K). The results obtained for  $\bar{V}_{\text{GF}}^0$  and  $\bar{V}_{\text{EtOH}}^0$  are in agreement with the negative excess volumes obtained. The variation of this property is presented in Figure 6 as a function of glycerol formal mole fraction at 298.15 K for glycerol formal and ethanol, respectively. These values were calculated as the difference between partial molar volumes and molar volumes presented in Table 3. For both solvents the partial molar volume diminishes as their respective proportion in the mixtures diminishes, except for ethanol in those mixtures where it is in great proportion.



**Figure 6.** Partial molar volumes of glycerol formal (●) and ethanol (■) calculated as differences respect to pure solvent volumes in glycerol formal + ethanol mixtures at 298.15 K.

### Redlich-Kister equation

The Redlich-Kister equation has been used in recent decades for manipulating several kinds of physicochemical values of mixtures such as: excess volumes, excess viscosities, solubilities in cosolvent mixtures, among others (Redlich, O. & Kister, A.T., 1948). When applied to excess molar volumes is presented as Equation (5),

$$V^{0-E} = x_1 x_2 \sum a_i (x_1 - x_2)^i \quad (5)$$

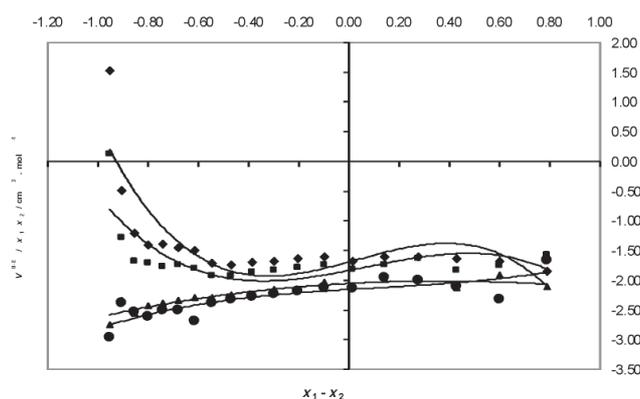
where  $x_1$  and  $x_2$  are the respective mole fractions.

In the analysis of our data about excess volumes, the Equation (5) was used in the form of third degree polynomial equations using least square analyses, obtaining four coefficients as presented in Equation (6).

$$\frac{V^{0-E}}{x_1 x_2} = a_0 + a_1 (x_1 - x_2) + a_2 (x_1 - x_2)^2 + a_3 (x_1 - x_2)^3 \quad (6)$$

The Redlich-Kister parameters for glycerol formal + ethanol mixtures at all temperatures studied are presented in Table 4 beside related determination coefficients and standard deviations calculated according to Equation (7) (where  $D$  is the number of compositions studied and  $N$  is the number of terms used in the regression, that is 19 and 4 respectively). Figure 7 shows the Redlich-Kister equation applied to glycerol formal + ethanol data at several temperatures.

$$\sigma(V^{0-E}) = \sqrt{\frac{\sum (V_{\text{expt}}^{0-E} - V_{\text{calc}}^{0-E})^2}{D - N}} \quad (7)$$



**Figure 7.** Regression adjusted to Redlich-Kister equation using four terms for glycerol formal + ethanol mixtures in mole fraction at several temperatures. 278.15 K (◆), 288.15 K (■), 298.15 K (▲), 308.15 K (★).

The variation coefficients greater than 0.94 (except at 288.15 and 293.15 K) indicate that the obtained regular polynomial regressions describe adequately the excess volumes. In similar way, standard deviations are similar to those presented in the literature for other kind of mixtures (Kapadi, U.R. *et al.* 2001; Salas, J.A. *et al.* 2002; Wahab, M.A. *et al.* 2002; Peralta, R.D. *et al.* 2003; Resa, J.M. *et al.*

2004; Ruidiaz, M.A. & Martínez, F. 2009; Cristancho, D.M. *et al.* 2011). On the other hand,  $\sigma$  values obtained for glycerol formal + ethanol mixtures were in general similarity to those obtained for glycerol formal + propylene glycol (near to  $0.030 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ , Rodríguez, G.A. *et al.* 2011), ethanol + propylene glycol (varying from 0.003 to  $0.021 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ , Jiménez, J. & Martínez, F., 2006), and glycerol formal + water (near to  $0.008 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ , Delgado, D.R. *et al.* 2011).

### Volume thermal expansion

In pharmaceutical pre-formulation studies, it is too important to know the variation of physicochemical properties related to pharmaceutical dosage forms, with respect to temperature changes; especially the properties that affect the concentration of active ingredients. Thus, the volume thermal expansion coefficients ( $\alpha$ ) were calculated by means of Equation (8) (Ott, J.B. & Boerio-Goates, J., 2000) by using the variation of molar volumes with temperature (Table 2).

$$\alpha = \frac{1}{V^0} \left( \frac{\partial V^0}{\partial T} \right)_{p,x} \quad (8)$$

Table 5 summarizes the  $(\partial V^0/\partial T)$  and  $\alpha$  values for all mixtures and pure solvents. In all cases linear models were obtained with determination coefficients greater than 0.999. The  $\alpha$  values varied from  $7.28 \times 10^{-4} \text{ K}^{-1}$  in pure glycerol formal to  $1.135 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$  in pure ethanol at 298.15 K although the  $\alpha$  variation is not linear with the mixtures composition.

### Data correlation using the Jouyban-Acree model

The Jouyban-Acree model was introduced to correlate the physicochemical properties of the solution in mixed solvents including the dielectric constants (Jouyban, A. *et al.* 2004), viscosity (Jouyban, A. *et al.* 2005a), solvatochromic parameter (Jouyban, A. *et al.* 2006), density (Jouyban, A. *et al.* 2005b), speed of sound (Hasan, M. *et al.*

**Table 4.** Redlich-Kister regression results for the excess volumes of glycerol formal + ethanol mixtures at various temperatures in mole fraction

$T / \text{K}$	$a_0$	$a_1$	$a_2$	$a_3$	$r^2$	$\sigma / \text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$
278.15	-1.6945	1.1589	0.3270	-3.1113	0.6916	0.0409
283.15	-1.8038	0.9608	0.2374	-2.5712	0.7825	0.0339
288.15	-1.8381	0.8314	0.3572	-1.7244	0.5682	0.0306
293.15	-1.9841	0.1711	-0.1807	0.4539	0.9285	0.0114
298.15	-2.0536	0.2233	-0.3222	0.0254	0.8578	0.0102
303.15	-2.1235	0.2344	-0.4761	-0.1687	0.9150	0.0111
308.15	-2.1557	0.2543	-0.0994	0.3091	0.7230	0.0230
313.15	-2.4351	0.3196	-0.2935	1.5102	0.7235	0.0293

**Table 5.** Volume thermal expansion coefficients of glycerol formal + ethanol mixtures at 298.15 K.

Glycerol formal		$100(\partial V^0/\partial T)/$ $\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	$10^4 \alpha/\text{K}^{-1}$
$\mu_{\text{GF}}$	$x_{\text{GF}}$		
0.0000	0.0000	6.660	11.35
0.0500	0.0228	6.292	10.63
0.1000	0.0469	6.312	10.55
0.1500	0.0724	6.265	10.37
0.2000	0.0996	6.240	10.21
0.2500	0.1285	6.162	9.97
0.3000	0.1594	6.063	9.69
0.3500	0.1924	5.996	9.45
0.4000	0.2278	6.097	9.48
0.4500	0.2658	6.086	9.32
0.5000	0.3068	6.039	9.10
0.5500	0.3510	6.086	9.02
0.6000	0.3990	5.914	8.60
0.6500	0.4511	5.993	8.54
0.7000	0.5080	5.918	8.26
0.7500	0.5704	6.007	8.19
0.8000	0.6390	5.918	7.87
0.8500	0.7149	5.866	7.60
0.9000	0.7993	5.936	7.46
0.9500	0.8937	6.187	7.53
1.0000	1.0000	6.205	7.28

*al.* 2006; **Kadam, U.B. et al.** 2006) and more recently molar volumes (**Cristancho, D.M. et al.** 2011; **Delgado, D.R. et al.** 2011; **Rodríguez, G.A. et al.** 2011). The model uses the physicochemical properties of the mono-solvents as input data and a number of curve-fitting parameters representing the effects of solvent-solvent interactions in the solution. It is basically derived for representing the solvent effects on the solubility of non-polar solutes in nearly ideal binary solvent mixtures at isothermal conditions by **Acree Jr., W.E.** (1992); and then its applications were extended to the solubility of polar solutes in water + cosolvent mixtures at isothermal conditions (**Jouyban-Gharamaleki, A. et al.** 1998). Further extensions were made to represent the solvent composition and temperature effects on the solubility of drugs (**Jouyban, A. et al.** 1998); and also some other parameters such as acid dissociation constants (**Jouyban, A. et al.** 2005c), electrophoretic mobility in capillary electrophoresis (**Jouyban-Gharamaleki, A. et al.** 2000) and retention factors in high performance liquid chromatography (**Jouyban, A. et al.** 2005d) have been calculated perfectly.

The model for representing the solvent composition and temperature effects on the density of solvent mixtures is:

$$\ln \rho_{m,T} = x_1 \ln \rho_{1,T} + x_2 \ln \rho_{2,T} + \frac{x_1 x_2}{T} \cdot \sum_{i=0}^2 J_i (x_1 - x_2) \quad (9)$$

where  $\rho_{m,T}$ ,  $\rho_{1,T}$ ,  $\rho_{2,T}$  are densities of mixed solvent, solvents 1 (glycerol formal) and 2 (ethanol) at different temperatures ( $T$ ), respectively. The  $x_1$ ,  $x_2$  are mole fractions of glycerol formal and ethanol, respectively. The  $J_i$  terms are coefficients of the model computed by using a no intercept regression analysis of:

$$\ln \rho_{m,T} - (x_1 \ln \rho_{1,T} + x_2 \ln \rho_{2,T}) = \quad (10)$$

$$J_0 \frac{x_1 x_2}{T} + J_1 \frac{x_1 x_2 (x_1 - x_2)}{T} + J_2 \frac{x_1 x_2 (x_1 - x_2)^2}{T}$$

The following equation was obtained for density correlation of mixtures of glycerol formal and ethanol at different temperatures after excluding non-significant model constants:

$$\ln \rho_{m,T} = x_1 \ln \rho_{1,T} + x_2 \ln \rho_{2,T} - 20.397 \frac{x_1 x_2}{T} \quad (11)$$

The calculated density values using Equation (11) are presented in Table 1. The mean relative deviation (MRD) between experimental and calculated data was calculated as an accuracy criterion using:

$$\text{MRD} = \frac{100}{N} \left( \frac{|\text{Calculated} - \text{Experimental}|}{\text{Experimental}} \right) \quad (12)$$

and was  $0.03 \pm 0.03 \%$  for Equation (11). The  $N$  in Equation (12) is the number of data points in the data set.

An adapted version of Equation (11) was used to represent the effects of solvent composition and temperature on the molar volume of mixed solvents in recent works (Cristancho, D.M. *et al.* 2011; Delgado, D.R. *et al.* 2011; Rodríguez, G.A. *et al.* 2011). A similar model could be trained to represent the molar volume data of glycerol formal + ethanol data at various temperatures as:

$$\ln V_{m,T} = x_1 \ln V_{1,T} + x_2 \ln V_{2,T} - 74.849 \frac{x_1 x_2}{T} - 25.836 \frac{x_1 x_2 (x_1 - x_2)}{T} - 8.430 \frac{x_1 x_2 (x_1 - x_2)^2}{T} \quad (13)$$

The calculated molar volume values are presented in Table 2. The model fits very well to the experimental data and the MRD was  $0.17 \pm 0.13 \%$ . In addition to the fitness capability of the model, it could be used to predict the molar volume data using the trained version of the model employing the minimum number of experimental data points. For this purpose, a minimum number of experimental data (11 odd data points of set 278.15 K and 11 odd data points of set 313.15 K) have been used for density and molar volume data and the following equations obtained:

$$\ln \rho_{m,T} = x_1 \ln \rho_{1,T} + x_2 \ln \rho_{2,T} - 20.217 \frac{x_1 x_2}{T} \quad (14)$$

$$\ln V_{m,T} = x_1 \ln V_{1,T} + x_2 \ln V_{2,T} - 74.733 \frac{x_1 x_2}{T} - 26.203 \frac{x_1 x_2 (x_1 - x_2)}{T} - 7.988 \frac{x_1 x_2 (x_1 - x_2)^2}{T} \quad (15)$$

The MRD values of Equations (14) and (15) for predicted densities and molar volumes were  $0.03 \pm 0.03 \%$  and  $0.15 \pm 0.12 \%$  ( $N = 150$ ). Figures 8 and 9 show the predicted values versus experimental values of density and molar volume, respectively. High regression coefficients ( $R^2 = 1.0000$  (i.e.  $> 0.9999$ ) for density and  $R^2 = 0.9997$  for molar volume) suggest the predictability and applicability of the Jouyban-Acree model to predict the density and molar volume data using a minimum number of experimental data.

## Conclusions

This work reports experimental information about the volumetric behavior of the glycerol formal + ethanol at eight temperatures commonly found in technological conditions. Thus, this work complements the information

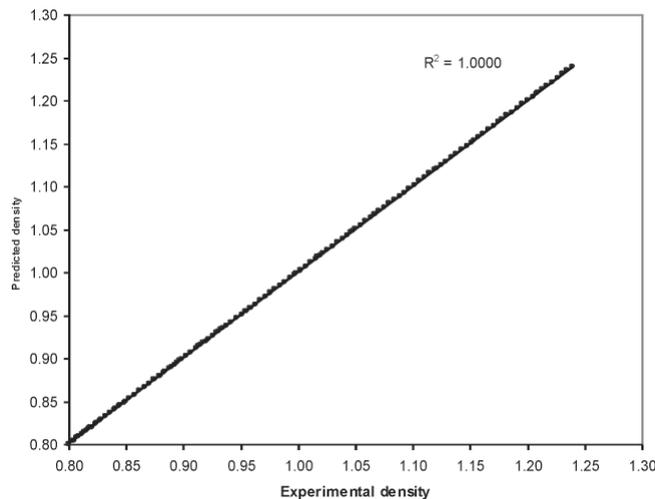


Figure 8. The predicted density values ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) using Equation (14) against the corresponding experimental values.

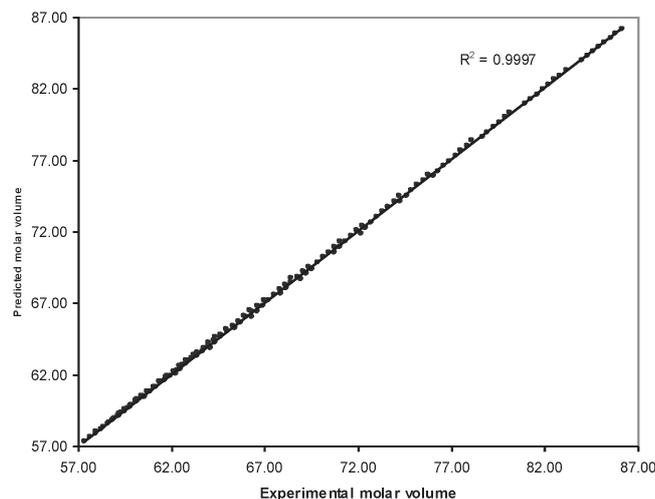


Figure 9. The predicted molar volume values ( $\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ ) using Equation (15) against the corresponding experimental values.

reported in the literature about volumetric properties of the possible binary mixtures conformed by glycerol formal, ethanol, propylene glycol, and water (Jiménez, J. *et al.* 2004; Jiménez, J. & Martínez, F., 2005, 2006; Delgado, D.R. *et al.* 2011; Rodríguez, G.A. *et al.* 2011). It can be concluded that this binary system shows non ideal behavior exhibiting negative deviations. These observations demonstrate that it is necessary to characterize systematically representative binary systems in order to have complete experimental information about the physical and chemical properties useful in the understanding of liquid pharmaceutical systems. Also, the Jouyban-Acree model can predict density and molar volume of solution in

mixtures of solvents at different temperatures using minimum number of experimental data points with acceptable accuracy in comparison with experimental data. Furthermore, the reported experimental values could be used to challenge other theoretical methods developed for estimation of thermophysical properties in mixtures (Prausnitz, J.M. *et al.* 1986).

### Acknowledgments

We thank the DIB of the Universidad Nacional de Colombia (UNC) by the financial support in addition to the Department of Pharmacy of UNC for facilitating the equipment and laboratories used in this investigation.

### References

- Acree Jr., W.E. 1992. Mathematical representation of thermodynamic properties: Part 2. Derivation of the combined nearly ideal binary solvent (NIBS)/Redlich-Kister mathematical representation from a two-body and three-body interactional mixing model. *Thermochim Acta* **198**:71-79.
- Arias, L.J., Díaz, A.J., Martínez, F. 2004. Viscosidad cinemática de mezclas ternarias formadas por agua, alcohol, propilenoglicol y glicerol formal a 25.0°C. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* **33**:20-37.
- Barton, A.F.M. 1991. "Handbook of Solubility Parameters and Other Cohesion Parameters". 2nd edition, New York, CRC Press, p.157-193.
- Battino, R. 1971. Volume changes on mixing for binary mixtures of liquids. *Chem Rev* **7**:5-45.
- Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E., Obenchain Jr., J.R., Gallipeau, J.A.R., D'Arecea, M.A. 2001. "The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals", 13th edition, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, pp. 799-800.
- Cristancho, D.M., Delgado, D.R., Martínez, F., Fakhree, M.A.A., Jouyban, A. 2011. Volumetric properties of glycerol + water mixtures at several temperatures and correlation with the Jouyban-Acree model. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* **40**:92-115.
- Delgado, D.R., Martínez, F., Fakhree, M.A.A., Jouyban, A. 2011. Volumetric properties of the glycerol formal + water cosolvent system and correlation with the Jouyban-Acree model. *Phys Chem Liq*. DOI: 10.1080/00319104.2011.584311.
- DiPietro J.A., Todd Jr., K.S., Reuter, V. 1986. Anti-strongyle activity of a propylene glycol-glycerol formal formulation of ivermectin in horses (mares). *Am J Vet Res* **47**:874-875.
- Fort, R.T., Moore, W.R. 1966. Viscosities of binary liquid mixtures. *Trans Faraday Soc* **62**:1112-1119.
- Hasan, M., Kadam, U.B. Hiray, A.P., Sawant, A.B. 2006. Densities, viscosities, and ultrasonic velocity studies of binary mixtures of chloroform with pentan-1-ol, hexan-1-ol, and heptan-1-ol at (303.15 and 313.15) K. *J Chem Eng Data* **51**:671-675.
- Jiménez, J., Manrique, J., Martínez F. 2004. Effect of temperature on some volumetric properties for ethanol + water mixtures. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* **33**:145-155.
- \_\_\_\_\_, Martínez, F. 2005. Study of some volumetric properties of 1,2-propanediol + water mixtures at several temperatures. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* **34**:46-57.
- \_\_\_\_\_, 2006. Volumetric properties of ethanol + 1,2-propanediol mixtures at different temperatures. *Phys Chem Liq* **44**:521-530.
- Jouyban, A., Soltanpour, Sh., Chan, H.K. 2004. A simple relationship between dielectric constant of mixed solvents with solvent composition and temperature. *Int J Pharm* **269**:353-360.
- \_\_\_\_\_, Khoubnasabjafari, M., Vaez-Gharamaleki, Z., Fekari, Z., Acree Jr., W.E. 2005a. Calculation of the viscosity of binary liquids at various temperatures using Jouyban-Acree model. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **53**:519-523.
- \_\_\_\_\_, Fathi-Azarbayjani, A., Khoubnasabjafari, M., Acree Jr., W.E. 2005b. Mathematical representation of the density of liquid mixtures at various temperatures using Jouyban-Acree model. *Indian J Chem A* **44**:1553-1560.
- \_\_\_\_\_, Soltani, S., Chan, H.K., Acree Jr., W.E. 2005c. Modeling acid dissociation constant of analytes in binary solvents at various temperatures using Jouyban-Acree model. *Thermochim Acta* **428**:119-123.
- \_\_\_\_\_, Rashidi, M.R., Vaez-Gharamaleki, Z., Matin, A.A., Djozan, Dj. 2005d. Mathematical representation of solute solubility in binary mixture of Supercritical fluids by using Jouyban-Acree Model. *Pharmazie* **60**:527-529.
- \_\_\_\_\_, Khoubnasabjafari, M., Acree Jr., W.E. 2006. Modeling the solvatochromic parameter ( $\sigma$ ) of mixed solvents with respect to solvent composition and temperature using the Jouyban-Acree model. *DARU*, **14**:22-25.
- Jouyban-Gharamaleki, A., Barzegar-Jalali, M., Acree Jr., W.E. 1998. Solubility correlation of structurally related drugs in binary solvent mixtures. *Int J Pharm* **166**:205-209.
- \_\_\_\_\_, Valae, L., Barzegar-Jalali, M., Clark, B.J., Acree Jr., W.E. 1999. Comparison of various cosolvency models for calculating solute solubility in water-cosolvent mixtures. *Int J Pharm* **177**:93-101.
- \_\_\_\_\_, Khaledi, M.G., Clark, B.J. 2000. Calculation of electrophoretic mobilities in water-organic modifier mixtures. *J Chromatogr A* **868**:277-284.
- Kadam, U.B., Hiray, A.P., Sawant, A.B., Hasan, M. 2006. Densities, viscosities, and ultrasonic velocity studies of binary mixtures of trichloromethane with methanol, ethanol, propan-1-ol, and butan-1-ol at T = (298.15 and 308.15) K. *J Chem Thermodyn* **38**:1675-1683.
- Kapadi, U.R., Hundiwale, D.G., Patil, N.B., Lande, M.K., Patil, P.R. 2001. Studies of viscosity and excess molar volume of binary mixtures of propane-1,2 diol with water at various temperatures. *Fluid Phase Equilib* **192**:63-70.
- Kestin, J. 1979. "A Course in Thermodynamics", McGraw-Hill, New York, pp. 331-332.

- Kratky, O., Leopold, H., Stabinger, H.** 1980. "DMA45 Calculating Digital Density Meter, Instruction Manual", Anton Paar, K.G., Graz, Austria, pp. 1-12.
- Lo, P.K.A., Fink, D.W., Williams, J.B., Blodinger, J.** 1985. Pharmacokinetic studies of ivermectin: Effects of formulation. *Veter Res Comm* **9**:251-268.
- Martínez, F., Gómez, A. Ávila, C.M.** 2002. Volúmenes molales parciales de transferencia de algunas sulfonamidas desde el agua hasta la mezcla agua-etanol ( $X = 0.5$ ). *Acta Farm Bonaerense* **21**:107-118.
- Ott, J.B., Boerio-Goates, J.** 2000. "Chemical Thermodynamics: Advanced Applications", Academic Press, London, pp. 271-291.
- Peralta, R.D., Infante, R., Cortez, G. Ramírez, R.R., Wisniak, J.** 2003. Densities and excess volumes of binary mixtures of 1,4-dioxane with either ethyl acrylate, or butyl acrylate, or methyl methacrylate, or styrene at  $T = 298.15$  K. *J Chem Thermodyn* **35**:239-250.
- Perrot, P.** 1998. "A to Z of Thermodynamics", Oxford University Press, Inc., New York, pp. 221-225.
- Pineda, L.M., Teatino, R.E., Martínez, F.** 2003. Propiedades fisicoquímicas de mezclas ternarias formadas por agua, alcohol, propilenglicol y glicerol formal a  $25^{\circ}\text{C}$ . *Rev Colomb Cienc Quím Farm* **32**:13-22.
- Pivnichny, J.V.** 1984. Separation and determination of the two components of glycerol formal by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* **2**:491-500.
- Prausnitz, J.M., Lichtenthaler, R.N., Gomes de Acedo, E.** 1986. "Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria", 2nd edition, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ, pp. 181-186.
- Redlich, O., Kister, A.T.** 1948. Algebraic representation of thermodynamic properties and the classification of solutions. *Ind Eng Chem* **40**:345-348.
- Reinemeyer, C.R., Courtney, C.H.** 2001. Antinematodal drugs, in: "Veterinary Pharmacology and Therapeutics", 8th edition, edited by Adams, H.R., Iowa State University Press & Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, p. 965.
- Resa, J.M., González, C., Goenaga, J.M., Iglesias, M.** 2004. Temperature dependence of excess molar volumes of ethanol + water + ethyl acetate. *J Solution Chem* **33**:169-198.
- Rodríguez, S.J., Cristancho, D.M., Neita, P.C., Vargas, E.F., Martínez, F.** 2010. Volumetric properties of the octyl methoxycinnamate + ethyl acetate solvent system at several temperatures. *Phys Chem Liq* **48**:638-647.
- Rodríguez, G.A., Delgado, D.R., Martínez, F., Fakhree, M.A.A., Jouyban, A.** 2011. Volumetric properties of glycerol formal + propylene glycol mixtures at several temperatures and correlation with the Jouyban-Acree model. *J Solution Chem* In press.
- Rubino, J.T.** 1988. Cosolvents and cosolvency, in: "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", Vol. 3, edited by Swarbrick, J., Boylan, J.C., Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 375-398.
- Ruidiaz, M.A., Martínez, F.** 2009. Volumetric properties of the pharmaceutical model cosolvent system 1,4-dioxane + water at several temperatures. *Vitae Rev Fac Quím Farm* **16**:327-337.
- Salas, J.A., Zurita, J.L., Katz, M.** 2002. Excess molar volumes and excess viscosities of the 1-chlorobutane + pentane + dimethoxyethane ternary system at  $298.15$  K. *J Argent Chem Soc* **90**:61-73.
- US Pharmacopeia.** 1994. 23rd edition, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, p. 43.
- Wahab, M.A., Azhar, M., Mottaleb, M.A.** 2002. Volumetric behaviour of binary liquid mixtures at a temperature of  $303.15$  K. *Bull Kor Chem Soc* **23**:953-956.
- Yalkowsky, S.H.** 1999. "Solubility and Solubilization in Aqueous Media", American Chemical Society and Oxford University Press, New York, pp. 180-235.

Recibido: junio 22 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.

# PERFORMANCE OF THE JOUYBAN-ACREE AND YALKOWSKY-ROSEMAN MODELS FOR ESTIMATING THE SOLUBILITY OF INDOMETHACIN IN ETHANOL + WATER MIXTURES

Miller A. Ruidiaz<sup>1</sup>, Daniel R. Delgado<sup>2</sup>, Fleming Martínez<sup>2</sup>

## Abstract

**Ruidiaz, M. A., D. R. Delgado, F. Martínez:** Performance of the Jouyban-Acree and Yalkowsky-Roseman models for estimating the solubility of indomethacin in ethanol + water mixtures. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **35** (136): 329-336, 2011. ISSN 0370-3908.

Indomethacin (IMC) is an anti-inflammatory drug whose physiochemical properties in aqueous solutions have not been studied thoroughly. For this reason, in this work the validity of the Jouyban-Acree and Yalkowsky-Roseman models is evaluated to predict the solubility of this compound in ethanol + water cosolvent mixtures. The solubility estimation is studied as a function of temperature and cosolvent composition. Both models require only the experimental solubility values in the pure solvents at all the temperatures evaluated. The solubility calculated values by using both models deviate notoriously from experimental values in several cases.

**Key words:** indomethacin; ethanol + water cosolvent mixtures; Jouyban-Acree and Yalkowsky-Roseman models.

## Resumen

“Desempeño de los modelos de Jouyban & Acree y Yalkowsky & Roseman en la estimación de la solubilidad de indometacina en mezclas cosolventes etanol + agua”.

La indometacina (IMC) es un fármaco antiinflamatorio cuyas propiedades fisicoquímicas en solución acuosa no han sido estudiadas ampliamente. Por esta razón, en este trabajo se evaluó la utilidad de los modelos Jouyban-Acree (J-A) y Yalkowsky-Roseman (Y-R) en la predicción de la

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Básicas, Corporación Tecnológica de Bogotá, Bogotá D.C., Colombia.

<sup>2</sup> Grupo de Investigaciones Farmacéutico-Fisicoquímicas, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá D.C., Colombia. Correo electrónico: fmartinezr@unal.edu.co

solubilidad de este fármaco en mezclas cosolventes etanol + agua. La estimación de la solubilidad se estudió en función de la temperatura y la composición cosolvente. Los dos modelos requieren únicamente los valores de solubilidad en los solventes puros a todas las temperaturas de interés. Los valores calculados se desvían significativamente de los experimentales en muchos casos.

**Palabras clave:** indometacina; mezclas etanol + agua; modelos de Jouyban-Acree y Yalkowsky-Roseman.

## Introduction

Indomethacin (IMC, Fig. 1) is an anti-inflammatory drug sometimes used in actual therapeutics (Budavari, S. *et al.* 2001; Raffa, R.B., 2005). Unfortunately, physicochemical properties of IMC useful at industrial level have not been thoroughly studied. In this context, it is well known that several physicochemical properties such as, the solubility and occupied volumes by active ingredients and excipients in adequate solutions, are very important for all the pharmaceutical scientists, because they facilitate the processes associated to design and development of new products in the pharmaceutical industries (Jiménez, F. & Martínez, F., 1995). Moreover, the reported techniques intended to predict these values are highly appreciated for practical applications because they diminish the economic and experimental efforts which imply significant reductions in costs and time during the design and development stages (Jouyban, A., 2010).

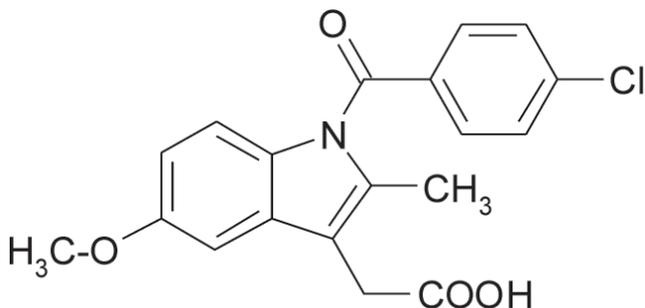


Figure 1. Molecular structure of indomethacin.

For these reasons, the main objective of this study was to evaluate the usefulness of Jouyban-Acree model (Jouyban, A. & Acree Jr., W.E., 2006) to predict the equilibrium solubility of IMC in binary mixtures conformed by ethanol and water as a function of the solvent composition and temperature. In similar way, the log-lineal model proposed by Yalkowsky, S.H. & Roseman, T.J. (1981) was also challenged in front to the experimental solubility values at equilibrium of this drug. Thus, this investigation expands the information reported previously for the

solubility estimation of naproxen and ketoprofen in the same cosolvent system (Vargas, E. *et al.* 2008; Gantiva, M. *et al.* 2009).

## Theoretical

The different strategies intended to estimate physicochemical properties of drugs are highly valued at industrial level. Several methods to estimate the solubility in solvent mixtures have been reported in the pharmaceutical and chemical literature (Jouyban-Gharamaleki, A. *et al.* 1999; Nokhodchi, A. *et al.* 2002). Some of them have been challenged recently in the correlation of the equilibrium solubility of several drugs (Jouyban, A., 2008; Jouyban, A., 2010).

As was already exposed (Vargas, E. *et al.* 2008; Gantiva, M. *et al.* 2009), the simplest model to predict drug solubility in cosolvent mixtures is the one based on the algebraic rule of mixing, which for semipolar compounds in binary mixtures takes the following form:

$$\log X_{2-\text{Mix}} = f \log X_{2-\text{Cosolv}} + (1-f) \log X_{2-\text{Water}} \quad (1)$$

where  $X_{2-\text{Mix}}$  is the drug solubility calculated in the cosolvent mixture considered,  $X_{2-\text{Cosolv}}$  is the drug solubility in the neat cosolvent,  $X_{2-\text{Water}}$  is the drug solubility in neat water, and  $f$  is the volume fraction of cosolvent in the mixture free of drug dissolved. This last term is calculated assuming additive volumes according to:

$$f = V_{\text{Cosolv}} / (V_{\text{Cosolv}} + V_{\text{Water}}) \quad (2)$$

where,  $V_{\text{Cosolv}}$  and  $V_{\text{Water}}$  are the respective volumes of cosolvent and water (Connors, K.A., 2002). Equation 1 is a practical form of the logarithmic-lineal model developed by Yalkowsky, S.H. & Roseman, T.J. (1981), which has the form:

$$\log S_{2-\text{Mix}} = \log S_{2-\text{Water}} + \sigma \cdot f \quad (3)$$

where  $S_{2-\text{Mix}}$  and  $S_{2-\text{Water}}$  are the solubilities (as molarity or mole fraction) in the cosolvent mixture and water, respectively, and  $\sigma$  is the solubilizing power factor in the same solute-solvent system. The  $\sigma$  term in equation 3 has

been correlated with several polarity indexes such as, octanol-water partition coefficients, Hildebrand solubility parameters, and interfacial tensions, among others (**Rubino, J.T. & Yalkowsky, S.H.**, 1987).

Nevertheless, it was found experimentally that the behavior of several lipophilic solutes deviate notoriously from this simple additive rule of solubility, in particular when the solvents used are amphiprotic. In particular, in the case of propylene glycol + water mixtures, **Rubino, J.T. & Obeng, E.K.** (1991) by studying the solubility of homologous series of some alkyl *p*-hydroxybenzoates and *p*-aminobenzoates, found negative deviations to equation 1 in water-rich mixtures and positive deviations in propylene glycol-rich mixtures. These authors suggested that cosolvent-water interactions were responsible on the observed deviations, and thereby, they exposed that cosolvent interact with water by two mechanisms, namely, (a) hydrophobic hydration by forming water “icebergs” around the non-polar groups in the cosolvent, and (b) interaction between the cosolvent hydroxyl group and water molecules by hydrogen bonding, which could increase the water-structure formation obtained because of the hydrophobic effect. Thus, both interactions lead to diminish the solute-solvent interactions and thereby, the drug solubility. Opposite, in those mixtures with high cosolvent proportion the hydrogen bonding among cosolvent and water is also present but the water-structure formation has diminished or it has disappeared.

As good attempt to consider the deviations non taken into account by equation 1 Jouyban and Acree proposed the equation 4, where  $T$  is the absolute temperature and  $J_i$  are the respective polynomial coefficients.  $J_i$  coefficients have theoretical meaning because each one of them is a function of the interaction energies among two and three bodies, which in turn describe the attractions among the different molecules present in solution. Equation 4 is derivate from the equation originally proposed by **Redlich, O. & Kister, A.T.** (1948), and its development as well as its meaning has been described previously in the literature (**Acree Jr., W.E.**, 1992; **Jouyban, A. et al.** 2006).

$$\log X_{2-\text{Mix}} = f \log X_{2-\text{Cosolv}} + (1-f) \log X_{2-\text{Water}} + f(1-f) \sum_{i=0}^n \frac{J_i (f - (1-f))^i}{T} \quad (4)$$

Recently, **Jouyban, A. & Acree Jr., W.E.** (2006) processed by regression analysis the reported solubility values (as mole fraction) of several drugs in ethanol + water mixtures in front of equation 4, obtaining the equation 5, whose

coefficients were statistically significant with  $p < 0.05$  according to the Student's t-test.

$$\log X_{2-\text{Mix}} = f \log X_{2-\text{Cosolv}} + (1-f) \log X_{2-\text{Water}} + \text{J-A factor} \quad (5)$$

where the Jouyban-Acree factor is defined according to:

$$\text{J-A factor} = f(1-f) \left[ \frac{724.21}{T} + \frac{485.17(f - (1-f))}{T} + \frac{194.41(f - (1-f))^2}{T} \right] \quad (5b)$$

## Experimental

### Reagents and Materials

In this investigation the following reagents and materials were used: indomethacin accomplishing the British Pharmacopoeia quality requirements (**BP 1998**, 1998), absolute ethanol A.R. Merck (EtOH), distilled water with conductivity  $< 2 \mu\text{S cm}^{-1}$ , molecular sieve Merck (numbers 3 and 4, pore size 0.3 and 0.4 nm, respectively), and Durapore® 0.45  $\mu\text{m}$  filters from Millipore Corp.

### Solvent mixtures preparation

The dehydrated EtOH employed was maintained over molecular sieve (Merck Number 3, 0.3 nm in pore diameter) to obtain a dry solvent previously to prepare the cosolvent mixtures. The ethanol dryness was demonstrated by the respective density value obtained ( $0.7854 \text{ g cm}^{-3}$  at 298.15 K), which was thus coincident with those reported in the literature (**Resa, J.M. et al.** 2004; **Belda, R. et al.** 2004). All EtOH + water cosolvent mixtures were prepared in quantities of 10.00 g by mass using an Ohaus Pioneer TM PA214 analytical balance with sensitivity  $\pm 0.1 \text{ mg}$ , in mass fractions from 0.10 to 0.90 varying by 0.10, in order to study nine binary mixtures and both pure solvents.

### Solubility determination

An excess of IMC was added to each aqueous cosolvent mixture evaluated in stoppered dark glass flasks. Solid-liquid mixtures were placed on thermostatic baths (Neslab RTE 10 Digital One Thermo Electron Company) kept at temperatures from  $293.15 \pm 0.05$  to  $313.15 \pm 0.05 \text{ K}$  with sporadic stirring for at least three days to reach the solution equilibrium (this equilibrium time was established by quantifying the IMC concentration up to obtain constant values). It is important to note that in water-rich mixtures this time was thus longer. Once at equilibrium, supernatant solutions were filtered (at isothermal conditions) to remove insoluble particles before the respective composition analyses. IMC concentrations in EtOH + water mixtures up to 0.40 in mass fraction of water were determined by mass balance by weighing a specified

quantity of the respective saturated solution and allowing the solvent evaporation up to constant mass. In the other hand, IMC concentrations in all the other systems studied (from 0.50 in mass fraction of water to pure water) were determined by measuring UV-absorbance after appropriate gravimetric dilutions with ethanol and interpolation from a previously constructed UV spectrophotometric calibration curve (UV/VIS BioMate 3 Thermo Electron Company spectrophotometer). All the solubility experiments were run at least in triplicate.

### Deviation calculations

As a deviation criterion between single experimental and calculated values by means of the Yalkowsky-Roseman and Jouyban-Acree models (Jouyban, A. & Acree Jr., W.E., 2006), the absolute errors (AE) were calculated for logarithmic solubilities according to:

$$AE = \left| \log X_{2-\text{Calc}} - \log X_{2-\text{Expt}} \right| \quad (6)$$

On similar way, as a general criterion of the usefulness of both equations the mean absolute errors (MAE) were calculated by means of the equation 7, where  $n$  is the number of mixtures compositions considered.

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \log X_{2-\text{Calc}} - \log X_{2-\text{Expt}} \right| \quad (7)$$

### Results and discussion

It is well known that the volume expressions of mixtures concentration are dependent on temperature because the volumes of liquids change with temperature according to their thermal volume expansion coefficients ( $\alpha$ ). For this reason, the variation of  $f$  with temperature in EtOH + water mixtures has been reported in the literature (Jiménez, J. *et al.*, 2004). In all cases this variation is lower than 0.60% and the mean values obtained at temperatures from 293.15 to 313.15 K are concordant with those reported at 303.15 K. For this reason the volume fractions obtained at 303.15 K were used in all calculations as has been made in other studies (Vargas, E. *et al.* 2008; Gantiva, M. *et al.* 2009).

Table 1 shows the experimental values of equilibrium solubility for this pharmaceutical compound expressed as decimal logarithms of mole fraction. The values used as input in equations 1 and 5 were those obtained in the neat solvents at all temperatures.

Table 2 shows the values of logarithmic solubility calculated by means of equations 1 and 5 as a function of mixtures composition and temperature. Individual and group percentage deviations with respect to equilibrium solubilities are also showed in this table.

By comparing the predictive results obtained for this drug by using both models it is clear that Jouyban-Acree model (equation 5) is not better than additive behavior

**Table 1.** Experimental solubility of IMC expressed as decimal logarithm as a function of mixtures composition and temperature. Values in parentheses are logarithmic uncertainties on equilibrium solubility.

$\mu_{\text{EtOH}}$	$f_{\text{EtOH}}$	293.15 K	298.15 K	303.15 K	308.15 K	313.15 K
0.0000	0.0000	-6.108 (0.021)	-6.031 (0.024)	-5.957 (0.020)	-5.895 (0.016)	-5.818 (0.027)
0.1000	0.1241	-5.915 (0.018)	-5.823 (0.026)	-5.727 (0.023)	-5.631 (0.019)	-5.552 (0.023)
0.2000	0.2417	-5.618 (0.010)	-5.514 (0.026)	-5.415 (0.025)	-5.309 (0.019)	-5.182 (0.024)
0.3000	0.3533	-5.070 (0.026)	-4.941 (0.020)	-4.816 (0.021)	-4.710 (0.023)	-4.563 (0.023)
0.4000	0.4594	-4.466 (0.023)	-4.344 (0.010)	-4.194 (0.010)	-4.076 (0.021)	-3.946 (0.018)
0.5000	0.5604	-3.922 (0.019)	-3.797 (0.024)	-3.676 (0.017)	-3.538 (0.011)	-3.394 (0.005)
0.6000	0.6566	-3.476 (0.004)	-3.335 (0.021)	-3.190 (0.027)	-3.093 (0.027)	-2.974 (0.029)
0.7000	0.7484	-3.099 (0.009)	-2.976 (0.028)	-2.844 (0.024)	-2.746 (0.021)	-2.649 (0.028)
0.8000	0.8360	-2.771 (0.017)	-2.661 (0.020)	-2.556 (0.021)	-2.463 (0.023)	-2.368 (0.006)
0.9000	0.9198	-2.568 (0.024)	-2.469 (0.017)	-2.371 (0.024)	-2.282 (0.029)	-2.207 (0.026)
1.0000	1.0000	-2.479 (0.025)	-2.380 (0.011)	-2.311 (0.005)	-2.210 (0.007)	-2.130 (0.004)

**Table 2.** Solubility of IMC calculated by means of additive-logarithmic model (equation 1) and Jouyban-Acree model (equation 4) expressed as decimal logarithm as a function of mixtures composition and temperature. Values in parentheses are absolute errors calculated according to equation 6.

Yalkowsky-Roseman model						
$f_{\text{EtOH}}$	293.15 K	298.15 K	303.15 K	308.15 K	313.15 K	MAE <sup>a</sup>
0.1241	-5.66 (0.26)	-5.58 (0.25)	-5.50 (0.22)	-5.44 (0.19)	-5.36 (0.19)	0.22 ± 0.03
0.2417	-5.23 (0.39)	-5.15 (0.37)	-5.08 (0.34)	-5.00 (0.31)	-4.93 (0.26)	0.33 ± 0.05
0.3533	-4.83 (0.24)	-4.74 (0.20)	-4.67 (0.15)	-4.59 (0.12)	-4.51 (0.05)	0.15 ± 0.08
0.4594	-4.44 (0.03)	-4.35 (0.01)	-4.28 (0.09)	-4.20 (0.13)	-4.12 (0.18)	0.09 ± 0.07
0.5604	-4.07 (0.15)	-3.98 (0.19)	-3.91 (0.24)	-3.83 (0.29)	-3.75 (0.36)	0.25 ± 0.08
0.6566	-3.73 (0.25)	-3.63 (0.30)	-3.56 (0.37)	-3.48 (0.38)	-3.40 (0.42)	0.35 ± 0.07
0.7484	-3.39 (0.29)	-3.30 (0.32)	-3.23 (0.38)	-3.14 (0.39)	-3.06 (0.41)	0.36 ± 0.05
0.8360	-3.07 (0.30)	-2.98 (0.32)	-2.91 (0.35)	-2.81 (0.35)	-2.73 (0.37)	0.34 ± 0.03
0.9198	-2.77 (0.20)	-2.67 (0.20)	-2.60 (0.23)	-2.51 (0.22)	-2.43 (0.22)	0.22 ± 0.01
						0.25 ± 0.11 <sup>b</sup>
Jouyban-Acree model						
$f_{\text{EtOH}}$	293.15 K	298.15 K	303.15 K	308.15 K	313.15 K	MAE <sup>a</sup>
0.1241	-5.48 (0.43)	-5.41 (0.42)	-5.34 (0.39)	-5.27 (0.36)	-5.20 (0.35)	0.39 ± 0.03
0.2417	-4.90 (0.72)	-4.83 (0.69)	-4.76 (0.66)	-4.69 (0.62)	-4.62 (0.56)	0.65 ± 0.06
0.3533	-4.36 (0.71)	-4.28 (0.66)	-4.22 (0.60)	-4.15 (0.56)	-4.08 (0.49)	0.60 ± 0.09
0.4594	-3.86 (0.61)	-3.78 (0.56)	-3.72 (0.47)	-3.65 (0.43)	-3.58 (0.37)	0.49 ± 0.10
0.5604	-3.41 (0.51)	-3.34 (0.46)	-3.28 (0.40)	-3.20 (0.34)	-3.13 (0.26)	0.39 ± 0.10
0.6566	-3.04 (0.44)	-2.96 (0.38)	-2.90 (0.29)	-2.82 (0.27)	-2.75 (0.22)	0.32 ± 0.09
0.7484	-2.74 (0.36)	-2.66 (0.32)	-2.60 (0.24)	-2.52 (0.23)	-2.45 (0.20)	0.27 ± 0.07
0.8360	-2.54 (0.23)	-2.46 (0.21)	-2.39 (0.16)	-2.31 (0.15)	-2.24 (0.13)	0.18 ± 0.04
0.9198	-2.45 (0.12)	-2.36 (0.11)	-2.29 (0.08)	-2.20 (0.08)	-2.13 (0.08)	0.09 ± 0.02
						0.38 ± 0.19 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> MAE is the mean absolute error at each mixture composition calculated according to equation 7.

<sup>b</sup> This MAE value is the overall mean absolute error by considering all cosolvent compositions.

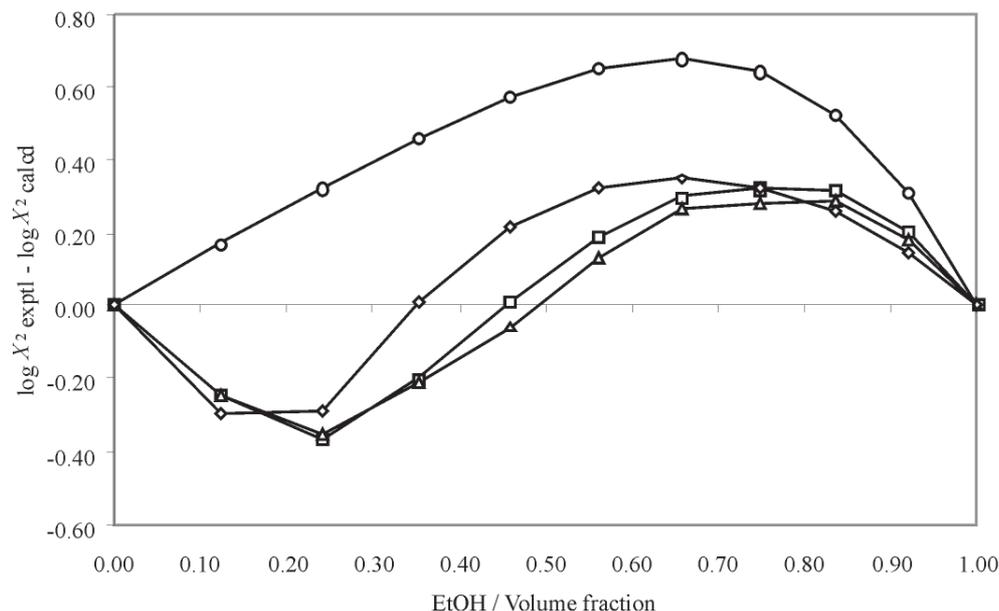
(equation 1), because of their MAE values, namely,  $0.38 \pm 0.19$  in the first case, in front to  $0.25 \pm 0.11$  in the case of equation 1. Thus, Yalkowsky-Roseman model would be useful at industrial level if equilibrium solubility estimations within 0.25 as decimal logarithm in uncertainty are allowed in the research and development of new homogeneous liquid products in the pharmaceutical industry.

To see more clearly these effects, Figure 2 shows the differences obtained between experimental solubilities for IMC at 298.15 K in front to those calculated by means of equation 1. In similar way, Figure 2 also shows the differences obtained between equations 1 and 5, respectively.

Figure 2 shows that differences obtained in front to Jouyban-Acree model are negative in all cases and dependent on solvent composition being larger in water-rich mixtures. Thus, experimental solubilities for IMC are lower than those predicted by equation 5.

As comparison Figure 2 also shows the behavior reported for naproxen (Vargas, E. *et al.* 2008) and ketoprofen (Gantiva, M. *et al.* 2009) which also are analgesic drugs. Accordingly, IMC exhibits similar trend as those reported for these drugs, but the results for IMC are almost the same as those reported for ketoprofen. Nevertheless, the main reasons for the last result are unclear because not apparent similitude is found between the physicochemical properties associated to IMC and ketoprofen polarities such as molar volume and Hildebrand solubility parameters ( $\delta$  values), as can be seen in Table 3 (Ruidiaz, M.A. & Martínez, F., 2009; Gantiva, M. & Martínez, F., 2010). More over, molar volume of ketoprofen is almost on the middle of those for IMC and naproxen, whereas, Hildebrand solubility parameter of ketoprofen is thus close to that for naproxen (Aragón, D.M. *et al.* 2008).

Because the equation 5 (Jouyban-Acree model) is an extension of equation 1, Figure 2 shows the excess factor



**Figure 2.** Logarithmic differences of drugs solubilities [experimental value minus calculated value according to Yalkowsky-Roseman model (equation 1)] for IMC ( $\square$ ), naproxen ( $\diamond$ , taken from Vargas, E. *et al.* (2008)), and ketoprofen ( $\Delta$ , taken from Gantiva, M. *et al.* (2009)) and logarithmic difference of calculated solubilities [value according to Jouyban-Acree model (equation 5) minus value according to Yalkowsky-Roseman model (equation 1)] ( $\circ$ ), as a function of the EtOH proportion in EtOH + water mixtures at 298.15 K.

**Table 3.** Molar volume and Hildebrand solubility parameter of some analgesic drugs.

Drug	Mol. Vol. / $\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$\delta / \text{MPa}^{1/2}$
IMC <sup>a</sup>	230.0	24.5
Ketoprofen <sup>b</sup>	195.6	22.5
Naproxen <sup>c</sup>	166.7	22.1

<sup>a</sup> Taken from Ruidiaz, M.A. & Martínez, F. (2009).

<sup>b</sup> Taken from Gantiva, M. & Martínez, F. (2010).

<sup>c</sup> Taken from Aragón *et al.* (2008).

of Jouyban-Acree (J - A factor), which is equivalent to the logarithmic difference between calculated solubilities using both equations, and it is a global excess solubility function.

Besides, Fig. 2 shows the logarithmic differences obtained between experimental values of IMC solubility and those calculated by assuming log-linear behavior (logarithmic additivity). This figure also shows the differences obtained in IMC calculated solubilities by using log-linear behavior (equation 1) and by using equation 5 (Jouyban-Acree model) at 298.15 K.

According to Fig. 2, IMC exhibits negative and positive deviations with respect to log-linear model and negative in front to Jouyban-Acree model. It is important to note

that IMC does not follow a similar trend to that described by Jouyban-Acree model which assumes positive deviations with respect to logarithmic additivity (log-linear model) in all mixtures. Thus IMC exhibits negative deviations in water-rich mixtures and positive deviations in EtOH-rich mixtures.

The trend exhibited by IMC in Fig. 2 is similar to those reported by Rubino, J.T. & Obeng, E.K. (1991) for the solubility of homologue series of some alkyl p-hydroxybenzoates and p-aminobenzoates in propylene glycol + water cosolvent mixtures. These solutes also exhibited negative deviations in water-rich mixtures and positive in PG-rich mixtures with respect to log-linear equation.

A possible explanation for negative deviations observed in the drug solubility at low cosolvent proportions could be found in the research reported by Kimura, F. *et al.* (1975), where similar behaviors were found in dissolution enthalpies of 1-methyl-2-pyrrolidinone in EtOH + water mixtures. According to these investigators at low cosolvent proportions the water retains its ability to form ordered structures.

Although alcohols of low molar masses have been considered as polar compounds, Matsumoto, Y. *et al.*

(1977) based on excess molar enthalpy values have presented some evidence about the influence of the ending methyl group on the water structure formation. The interactions present between alcohols and water could diminish the interactions between water and the drug leading to lower solubility values as expected according to log-linear model.

On the other hand, at high cosolvent concentrations in the mixtures the tridimensional structure of water is lost and therefore the water molecules could be available to interact with the drug molecules. This event would lead to larger solubilities than those expected according to log-linear model (equation 1). According to the literature another plausible explanation to positive deviations to log-linear equation could be due to possible drug association phenomenon in the saturated solution (Rubino, J.T. & Obeng, E.K., 1991). Nevertheless, in order to verify this fact it would be necessary to dispose of any other kind of experimental evidence, such as organic solvent/water drug distribution coefficients at several concentrations and temperatures.

## Conclusions

From all topics discussed previously it follows that IMC experimental solubilities present negative deviations in front to those predicted by the Jouyban-Acree model in the EtOH + water binary solvent system at all compositions studied. Opposite, IMC solubility shows negative and positive deviations in front to Yalkowsky-Roseman model. These estimation differences are within 0.38 in decimal logarithm units as mean, whereas, Yalkowsky-Roseman model imply differences around 0.25 in log units as mean. These results make possible the use of the Yalkowsky-Roseman model if these differences are allowed along the different stages involved in the design and development of new products in the pharmaceutical industries.

## Acknowledgements

The authors thank to the DIB the Universidad Nacional de Colombia (UNC) for the financial support and the Department of Pharmacy of UNC for facilitating the equipments and installations used in the experimental solubility determinations. Also to Prof. A. Jouyban of Tabriz University of Medical Sciences (Iran) for donating the bibliographic material required in this investigation.

## References

- Acree Jr., W.E. 1992. Mathematical representation of thermodynamic properties. Part 2. Derivation of the combined nearly ideal binary solvent (NIBS)/Redlich-Kister mathematical representation from a two-body and three-body interactional mixing mode. *Thermochim Acta* **198**:71-79.
- Aragón, D.M., Pacheco, D.P., Ruidiaz, M.A., Sosnik, A.D., Martínez, F. 2008. Método extendido de Hildebrand en la predicción de la solubilidad de naproxeno en mezclas cosolventes etanol + agua. *Vitae, Rev Fac Quím Farm* **15**:113-122.
- Belda, R., Herraiz, J.V., Diez, O. 2004. Rheological study and thermodynamic analysis of the binary system (water/ethanol): Influence of concentration. *Phys Chem Liquids* **42**: 467-476.
- BP 1988. The British Pharmacopoeia, Her Majesty's Stationery Office, London, Vol. I. p. 310.
- Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E., Obenchain Jr, J.R., Gallipeau, J.A.R., D'Arecea, M.A. 2001. "The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals", 13<sup>th</sup> edition, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J. p. 892.
- Connors, K.A. 2002. "Thermodynamics of Pharmaceutical Systems: An Introduction for Students of Pharmacy", Wiley-Interscience, Hoboken, N.J. pp. 61-66.
- Gantiva, M., Yurquina, A., Martínez, F. 2009. Desempeño de los modelos de Yalkowsky & Roseman y de Jouyban & Acree en la estimación de la solubilidad del ketoprofeno en mezclas cosolventes etanol + agua. *Vitae, Rev Fac Quím Farm* **16**:361-368.
- \_\_\_\_\_, Martínez, F. 2010. Método extendido de Hildebrand en la predicción de la solubilidad del ketoprofeno en mezclas cosolventes etanol + agua. *Quím Nova* **33**:370-376.
- Jiménez, F. Martínez, F. 1995. Una estrategia para la selección sistemática de vehículos en el diseño de formas farmacéuticas líquidas homogéneas. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* **24**:19-23.
- Jiménez, J. Manrique, J., Martínez, F. 2004. Effect of temperature on some volumetric properties for ethanol + water mixtures. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* **33**:145-155.
- Jouyban, A., Acree Jr., W.E. 2006. In silico prediction of drug solubility in water-ethanol mixtures using Jouyban-Acree model. *J Pharm Pharmaceut Sci* **9**:262-269.
- \_\_\_\_\_, Chew, N.Y.K., Chan, H.K., Khoubnasabjafari, M., Acree Jr., W.E. 2006. Solubility prediction of salicylic acid in water-ethanol-propylene glycol mixtures using Jouyban-Acree model. *Pharmazie* **61**:318-331.
- Jouyban, A. 2008. Review of the cosolvency models for predicting solubility of drugs in water-cosolvent mixtures. *J Pharm Pharmaceut Sci* **11**: 32-58.
- \_\_\_\_\_. 2010. "Handbook of Solubility Data for Pharmaceuticals", CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. pp. 30-58.
- Jouyban-Gharamaleki, A., Valaee, L., Barzegar-Jalali, M., Clark, B.J., Acree Jr., W.E. 1999. Comparison of various cosolvency models for calculating solute solubility in water-cosolvent mixtures. *Int J Pharm* **177**: 93-101.
- Kimura, F., Murakami, S., Fujishiro, R. 1975. Thermodynamics of aqueous solutions of nonelectrolytes. II. Enthalpies of

- transfer of 1-methyl-2-pyrrolidinone from water to many aqueous alcohols. *J Solution Chem* **4**:241-247.
- Matsumoto, Y., Touhara, H., Nakanishi, K., Watanabe, N.** 1977. Molar excess enthalpies for water + ethanediol, + 1,2-propanediol, and + 1,3-propanediol at 298.15 K. *J Chem Thermodyn* **9**:801-805.
- Nokhodchi, A., Shokri, J., Barzegar-Jalali, M., Ghafourian, T.** 2002. Prediction of benzodiazepines solubility using different cosolvency models. *Farmaco* **57**:555-557.
- Raffa, R.B.** 2005. Analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory drugs, in: "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 21<sup>st</sup> ed., Edited by Gennaro, A. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp. 1524-1542.
- Redlich, O., Kister, A.T.** 1948. Algebraic representation of thermodynamic properties and the classification of solutions. *Ind Eng Chem* **40**:345-348.
- Resa, J.M., González, C., Goenaga, J.M., Iglesias, M.** 2004. Temperature dependence of excess molar volumes of ethanol + water + ethyl acetate. *J Solution Chem* **33**:169-198.
- Rubino, J.T., Yalkowsky, S.H.** 1987. Cosolvency and cosolvent polarity. *Pharm Res* **4**:220-230.
- \_\_\_\_\_, **Obeng, E.K.** 1991. Influence of solute structure on deviations from the log-linear solubility equation in propylene glycol : water mixtures. *J Pharm Sci* **80**:479-483.
- Ruidiaz, M.A., Martínez, F.** 2009. Método extendido de Hildebrand en la estimación de la solubilidad de la indometacina en mezclas acetato de etilo + etanol. *Rev Colomb Quím* **38**:235-247.
- Vargas, E., Sosnik, A., Martínez, F.** 2008. Aplicación del modelo de Jouyban-Acree para la estimación de la solubilidad del naproxeno en mezclas cosolventes etanol + agua. *Lat Am J Pharm* **27**:654-660.
- Yalkowsky, S.H., Roseman, T.J.** 1981. Solubilization of drugs by cosolvents, in "Techniques of Solubilization of Drugs", Edited by Yalkowsky, S.H. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 91-134.

Recibido: junio 28 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.

# RÁPIDA CONSTRUCCIÓN DE UNA LIBRERÍA DE LOS PRODUCTOS DE CULTIVO DE 14 BACTERIAS DEL *PHYLUM* FIRMICUTES SIMBIONTES DEL OCTOCORAL *PSEUDOPTEROGORGIA ELISABETHAE* DE LA ISLA DE PROVIDENCIA (CARIBE SUR-OCCIDENTAL)

Hebelin Correa<sup>1</sup>, Fabrice Berru<sup>2</sup>, Brad Haltli<sup>2</sup>, Carmenza Duque<sup>1,\*</sup>, Russell Kerr<sup>2,3\*</sup>

## Resumen

**Correa H., F. Berru<sup>2</sup>, B. Haltli, C. Duque, R. Kerr:** Rápida construcción de una librería de los productos de cultivo de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* de la isla de Providencia (Caribe Sur-occidental). Rev. Acad. Colomb. Cienc. **35** (136): 337-348, 2011. ISSN 0370-3908.

El presente trabajo, describe el desarrollo de una estrategia metodológica para acelerar y simplificar la detección e identificación de los compuestos producidos en cuatro medios de cultivo diferentes, por 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* de la Isla de Providencia, Caribe Sur-Occidental. El proceso involucró la miniaturización de los cultivos bacterianos, la extracción en fase sólida de los productos usando la resina Diaion™ HP-20, el análisis por UPLC-MS de los mismos y finalmente la generación de una librería que permitió descartar los componentes o productos de descomposición de los medios de cultivo, además de detectar 46 compuestos producidos por el total de las bacterias y la posterior identificación de 10 de ellos, haciendo uso de la base de datos Antibase 2007™ como herramienta de derreplicación de las sustancias detectadas.

**Palabras clave:** librería de productos producidos por bacterias del *phylum* Firmicutes; *screening* químico de productos de cultivo de bacterias del *phylum* Firmicutes; Bacterias asociadas con *Pseudopterogorgia elisabethae*; UPLC-MS; Identificación por Antibase 2007™.

<sup>1</sup> Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Cra 30 # 45-03, Bogotá D.C, Colombia.

<sup>2</sup> Department of Chemistry, University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, C1A 4P3, Charlottetown, PEI, Canadá.

<sup>3</sup> Department of Biomedical Sciences, University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, C1A 4P3, Charlottetown, PEI, Canadá.

\* E-mails: rkerr@upei.ca (R.K.); cduqueb@unal.edu.co (C.D.)

### Abstract

This paper describes a convenient strategy to accelerate and simplify the detection and identification of compounds produced in four different culture media, by 14 bacteria of the *phylum* Firmicutes, symbionts of the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at Providencia Island, South-West Caribbean. The process involved: bacterial culture miniaturization, solid phase extraction of the products using the resin Diaion™ HP-20, the analysis by UPLC-MS of the products and finally the generation of the library, that allows to discard culture media components detecting 46 compounds produced by all bacteria and the subsequent identification of 10 of them, using the database Antibase 2007™ as a tool for dereplication of these substances.

**Key words:** library of the products produced by bacteria belonging to the *phylum* Firmicutes; chemical screening of compounds produced by bacteria belonging to the *phylum* Firmicutes; *Pseudopterogorgia elisabethae*-associated bacteria; UPLC-MS; Identification by Antibase 2007™.

### Introducción

Desde el descubrimiento de la penicilina y su producción a gran escala durante la segunda guerra mundial, los microorganismos han sido objeto de múltiples estudios motivados por la gran variedad de compuestos y medicamentos que son producidos a partir de ellos (Berdy, 2005). Específicamente, para el caso de los microorganismos marinos, a pesar de que fueron inicialmente detectados en simbiosis con invertebrados desde hace muchos años, no fue sino hasta la década de los ochenta cuando el número de publicaciones de productos naturales a partir de ellos aumentó vertiginosamente, hasta el punto de igualar el número de compuestos publicados por año, al de los aislados a partir de cnidarios (Blunt *et al.* 2009), convirtiéndose además en una fuente renovable de sustancias con estructura química novedosa, sin contraparte con los reportados para otros organismos marinos o terrestres, y con un alto potencial biomédico e industrial (Blunt *et al.* 2011; Newman y Hill 2006; Piel, 2006).

Generalmente, los microorganismos marinos pueden encontrarse en forma libre o en organizaciones simbióticas con invertebrados, desarrollando adaptaciones más especializadas, estables, y específicas al microambiente creado por el organismo hospedero (Egan *et al.* 2008), allí son en gran parte los responsables del ciclo de nutrientes, así como también de la producción de moléculas bioactivas, las cuales pueden estar involucradas en la prevención de la depredación y colonización del holobionte por otros microorganismos y macroorganismos (Mydlarz *et al.* 2010; Mouchka *et al.* 2010).

Actualmente, el estudio de obtención de compuestos naturales a partir microorganismos comprende inicialmente su cultivo en lo posible en diferentes condiciones, seguido de la extracción y fraccionamiento de los compuestos

producidos, su identificación y posterior conservación tanto de mezclas como de los compuestos puros en librerías (Penesyan *et al.* 2010), las cuales son mucho más diversas en cuanto a la clase de compuestos presentes en ellas (posibles nuevos compuestos, diferentes tipos de esqueleto de carbono y diferente estereoquímica), en comparación a las librerías existentes de compuestos sintéticos (Ito *et al.* 2011). Sin embargo, con el fin de evitar el largo proceso de aislamiento e identificación de compuestos con estructuras nuevas o conocidas y con actividad biológica, que se presenta como uno de los principales retos a enfrentar por parte de los científicos de productos naturales, se prefiere utilizar la combinación cultivos microbianos miniaturizados con técnicas de análisis como UPLC-MS (Cromatografía líquida de ultraeficiencia acoplada a espectrometría de masas) para la construcción de dichas librerías, como un procedimiento de derreplicación mucho más rápido y conveniente que solo hasta ahora se está empezando a usar para la identificación temprana de fuentes alternas de compuestos nuevos o conocidos con actividad biológica (Berrue *et al.* 2011). Sin embargo, es importante anotar que la investigación tradicional partiendo del escalamiento del cultivo, seguido de extracción, aislamiento por métodos cromatográficos convencionales y determinación estructural por los métodos espectroscópicos usuales, sigue siendo el único método para la identificación inequívoca de las sustancias producidas por microorganismos.

Por otro lado, en el estudio de microorganismos marinos simbióticos, la cercana asociación metabólica entre los microorganismos y su hospedero hace difícil revelar cuál es el organismo u organismos responsables de la producción de un determinado metabolito, en algunos casos se ha demostrado que muchos de los productos bioactivos, atribuidos previamente a los invertebrados, son producidos

dos por sus microorganismos asociados (Flatt *et al.* 2005; Ridley *et al.* 2005; Hildebrand *et al.* 2004). Por ejemplo en el caso del briozoo *Bugula neritina* productor del macrólido briostatina, potente agente anticáncer comercial, se ha establecido que es en realidad su bacteria simbionte *Endobugula serluta* quien produce el metabolito bioactivo (Sudek *et al.* 2007). Otro ejemplo es Yondelis® un medicamento antitumoral, descubierto en el tunicado colonial *Ecteinascidia turbinata*, el cual es actualmente sintetizado a partir del precursor biosintético la ciano-safracina B producida por la bacteria *Pseudomonas fluorescens* (Mayer *et al.* 2010). También vale la pena mencionar el aislamiento de la kahalalida F, un agente anticáncer muy próximo a ser aprobado como droga comercial, a partir del cultivo de la bacteria *Vibrio* sp., este compuesto inicialmente fue aislado del molusco *Elysia rufescens* (Hill *et al.* 2007).

En el caso del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*, el cual ha sido fuente de más de 100 compuestos diferentes con estructura química novedosa y con diversas actividades biológicas (Marrero *et al.* 2010; Heckrodt y Mulzer, 2005) y particularmente el recolectado por nosotros en la Isla de Providencia (Caribe Colombiano, Sur-Occidental), del cual aislamos los compuestos PsP-V, PsG, PsK, seco-PsJ y seco-PsK (Duque *et al.* 2004, 2006) con actividades antiinflamatoria, citotóxica y antimicrobiana promisorias (Correa *et al.* 2009, 2011a), éstos no han podido continuar en fases posteriores de bioprospección para su implementación como drogas, debido a problemas de suministro, convirtiéndose éste en la mayor limitación para su posible aplicación en la industria farmacéutica y cosmética (Mayer *et al.* 2010; Newman y Hill, 2006). Por esta razón el estudio de sus microsimbiontes como posible fuente de los compuestos bioactivos mencionados resulta ser una tarea inaplazable.

Así, el presente trabajo describe el desarrollo de una estrategia o aproximación metodológica para acelerar y simplificar la identificación de los compuestos producidos por 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbiontes del octocoral *P. elisabethae*, previamente caracterizadas morfológica y filogenéticamente usando la secuencia del gen ribosomal 16S rRNA (Correa *et al.* 2011b), generando una librería de los compuestos producidos por dichas bacterias cultivadas en cuatro medios diferentes. Este trabajo involucró varias etapas secuenciales: a) cultivo miniaturizado de las bacterias en placas multipozos de 5 ml b) extracción de los compuestos producidos en los cultivos c) *screening*-químico rápido de los extractos que contiene los compuestos producidos por las bacterias por UPLC-MS y d) análisis posterior por derreplicación de los productos detectados en los cultivos, usando la plataforma AntiBase 2007™.

## Parte experimental

### Recolección de *P. elisabethae*

Fragmentos del octocoral *P. elisabethae* fueron recolectados en la Isla de Providencia (Caribe Sur-Occidental, Colombiano) mediante buceo autónomo SCUBA a una profundidad entre 20 y 30 m en mayo de 2008 e identificados por la profesora Mónica Puyana de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Especímenes de referencia codificados como INV CNI 1612-1616, se encuentran en la colección de invertebrados del Museo de Historia Natural Marina Colombiana (MHNMC) en el Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betón (INVEMAR).

### Bacterias simbiontes de *P. elisabethae*

Del cnidario mencionado se aislaron las bacterias simbiontes cultivables, por técnicas tradicionales de cultivo y se identificaron morfológica y filogenéticamente estudiando la secuencia del gen ribosomal 16S rRNA de acuerdo a la metodología descrita por Correa *et al.* 2011b. De las 40 bacterias simbiontes aisladas, 14 bacterias del *phylum* Firmicutes pertenecientes a las familias Bacillaceae: *Bacillus firmus* (RKHC-13), *Bacillus horneckiae* (RKHC-68A), *Bacillus licheniformis* (RKHC-21), *Bacillus mojavensis* (RKHC-37), *Bacillus pumilus* (RKHC-57A), *Bacillus anthracis* (RKHC-13), *Bacillus cereus* (RKHC-9) *Oceanobacillus profundis* (RKHC-62B) y *Oceanobacillus iheyensis* (RKHC-82A); Paenibacillaceae: *Paenibacillus glucanolyticus* (RKHC-8); y Staphylococcaceae: *Staphylococcus epidermidis* (RKHC-78A), *Staphylococcus warneri* (RKHC-78B), *Staphylococcus equorum* (RKHC-54) y *Staphylococcus auricularis* (RKHC-48), fueron utilizadas en este trabajo. Estas bacterias hacen parte de la colección de referencia codificada como RKHC (Código interno), disponible en el laboratorio de Productos Naturales Marinos del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, cuya clasificación y números de acceso en el GenBank (JQ282814-JQ282828) están reportadas en Correa *et al.* 2011b. Las bacterias fueron cultivadas en medio marino (Difco 2216) semisólido y en medio marino (Difco 2216) /glicerol (1:1) y conservadas a 4°C y a -80°C, respectivamente.

### Preinóculo

Cada una de las bacterias arriba mencionadas fueron cultivadas en placas de agar sólido marino (Difco 2216) por un tiempo no mayor a 48 h, luego fueron utilizadas para realizar su correspondiente inóculo en 10 ml de medio (Difco 2216) y posteriormente incubadas en condiciones aeróbicas por un período de 48 h, a 200 rpm y a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo, el preinóculo de

cada bacteria sirvió como medio de alimentación para los posteriores cultivos.

### Condiciones de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron seleccionados de acuerdo a la fuente de carbono, nitrógeno y fosfato, además de la concentración de los mismos, con el fin de estimular la producción de metabolitos secundarios, éstos fueron caldo marino (**MB**: Peptona 5,0 g/l, Extracto de levadura 1,0 g/l, Citrato férrico 0,1 g/l, NaCl 19,45 g/l, MgCl<sub>2</sub> 5,9 g/l, MgSO<sub>4</sub> 3,24 g/l, CaCl<sub>2</sub> 1,8 g/l, KCl 0,55 g/l, NaHCO<sub>3</sub> 0,16 g/l, KBr 0,08 g/l, SrCl<sub>2</sub> 0,034 g/l, Ácido bórico 0,022 g/l, Silicato de sodio 0,004 g/l, NaF 0,0024 g/l, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,0016 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,008 g/l), caldo marino mínimo (**MMB**: Glutamato de sodio 2,0 g/l, NaCl 20,0 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 7,0 g/l, MgCl<sub>2</sub> 5,3 g/l, CaCl<sub>2</sub> 1,25 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,075 g/l, FeSO<sub>4</sub> 0,025 g/l, CuSO<sub>4</sub> 0,005 g/l, y Tris 6,1 g/l), caldo Takashi (**TAK**: Almidón 30,0 g/l, Dextrosa 5,0 g/l, Peptona 10,0 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0,5 g/l, y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/l) y caldo nutritivo dilución a diez (**NB/10**: Peptona 0,5 g/l y Extracto de carne 0,3 g/l). Todos los medios fueron preparados con agua desionizada y esterilizados junto con la resina Diaion™ HP-20.

Todos los cultivos se realizaron en presencia de la resina Diaion™ HP-20, la cual fue previamente activada con MeOH grado HPLC (1/2 p/v), durante un período de 4 h, a 300 rpm a temperatura ambiente, paso seguido la resina fue filtrada y lavada tres veces con agua Milli Q. Finalmente, la resina fue filtrada y agregada a los caldos de cultivo previo a su posterior esterilización.

El cultivo de las 14 bacterias se realizó en placas de poliestireno de 24 pozos de 10 ml. Doscientos cincuenta microlitros del preinóculo fueron puestos por triplicado en cada uno de los cuatro medios de cultivo empleados, paso seguido a la inoculación, las placas fueron cubiertas con una membrana transpirable estéril adhesiva de nylon, e incubadas aeróbicamente durante 96 h (**MB** y **TAK**) ó 144 h (**MMB** y **NB/10**), a 200 rpm y a 30°C. En todos los casos el volumen total de cultivo fue de 5 ml y en presencia de la resina Diaion™ HP-20 a una concentración final de 10% p/v. En todos los casos se empleó un blanco correspondiente a los medios de cultivo sin inocular, el cual sirvió como control de crecimiento y de posibles componentes del medio retenidos en la resina.

### Extracción

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, las placas se dejaron decantar con el fin de eliminar con ayuda de una micropipeta, la mayor cantidad de caldo de cultivo

y biomasa sobrenadante, posteriormente la resina Diaion™ HP-20 fue lavada tres veces con 5 ml de agua estéril desionizada, agitando las placas de cultivo a 200 rpm a temperatura ambiente por un período mínimo de 2 h entre cada lavado, con el fin de eliminar la mayor cantidad de sales y de medio retenidos en la resina. Paso seguido se realizó la extracción por duplicado con 5 ml de alcohol grado histológico (AcOEt/EtOH/MeOH 5:90:5). Para la primera extracción se dejó la resina en contacto con el solvente por un período de 3 h y la segunda durante la noche. Las fases orgánicas fueron reunidas y concentradas a presión reducida y pesadas con el fin de determinar la cantidad de extracto obtenido para cada cultivo.

### Análisis por UPLC-MS

A partir del extracto crudo de cada uno de los cultivos, se prepararon diluciones de las muestras en el rango de 1-5 mg/ml con MeOH grado HPLC, para el análisis en UPLC-MS en placas de 96 pozos de 2 ml. En todos los casos se analizaron en las mismas condiciones los extractos crudos de los medios de cultivo sin inocular y un blanco de solvente (MeOH grado HPLC).

La cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS) se realizó en un cromatógrafo Thermo Scientific Accela equipado con un automuestreador Accela que permite el análisis de muestras contenidas en placas de 96 pozos. Como detectores se emplearon el detector Accela PDA (Photodiode Array) monitoreando en un rango de longitudes de onda entre 200-600 nm, el detector ELSD (Evaporative Light Scattering Detector), Sedere, Sedex LT-ELSD Modelo 80LT a una temperatura de 35°C, y finalmente un MS (Mass Spectrometer), espectrómetro de masas lineal de trampa de iones Thermo Scientific LTQ en modo de ionización química a presión atmosférica (APCI), utilizando como gas nebulizador nitrógeno. Se detectaron iones positivos con masas entre 50 y 2000 u. La columna cromatográfica empleada fue una ACQUITY UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm. Se inyectaron en todos los casos 20 µl de muestra, utilizando como fase móvil un gradiente discontinuo de polaridad con MeOH modificado con ácido fórmico al 0.1% (SOL 1) y agua modificada con ácido fórmico al 0.1% (SOL 2). Se empleó el siguiente programa: tiempo 0.0 min, SOL 1/SOL 2 5:95; flujo 500 µl/min; 1.20 min, SOL 1/SOL 2 95:5, 500 µl/min; 5.00 min, SOL 1 100%, 500 µl/min; 5.20 min, SOL 1 100%, 900 µl/min; 8.50 min, SOL 1 100%, 900 µl/min; 8.70 min, SOL 1 100%, 600 µl/min; 8.90 min, SOL 1/SOL 2 5:95, 900 µl/min; 9.00 min SOL 1/SOL 2 5:95, 600 µl/min y 10 min SOL 1/SOL 2 5:95, 600 µl/min.

### Análisis de los cromatogramas

Una vez que todas las muestras (extractos de las 14 bacterias en 4 medios diferentes por triplicado, junto con los controles de medios y de MeOH. Total: 192 inyecciones) fueron analizadas por UPLC-MS, se procedió a buscar en cada uno de los cromatogramas sustancias que presentaran señal tanto en el ELSD como en el detector de masas, registrando su tiempo de retención junto con el ion  $[M+H]^+$  del espectro de masas, y anotando en cada caso si el compuesto era también visible en el detector PDA, debido a grupos cromóforos en su estructura. En total se lograron identificar 593 señales distintas en los cromatogramas para todo el conjunto de inyecciones, éstas sirvieron para generar el primer insumo de la base de datos aquí reportada haciendo uso del software Xcalibur™, del equipo de UPLC-MS, el cual realiza la búsqueda simultánea de determinada sustancia con un tiempo de retención y una masa establecida, en todos los cromatogramas, y genera una gráfica en tres dimensiones, donde se relaciona, la muestra (bacterias, medios sin inocular y metanol) vs. medios de cultivo, vs. el área bajo la curva. El haber realizado el cultivo de cada bacteria por triplicado, sirvió para descartar posibles falsos positivos. El análisis de las gráficas permitió establecer cuáles de las 593 señales corresponden a ruido en el equipo (presente en todos los cromatogramas), a contaminación de la columna (presente en los cromatogramas del MeOH) y a componentes del medio remanentes en la resina HP-20 (presente en los cromatogramas del medio). Así, se logró determinar que de las 593 señales, tan solo 46 correspondían a verdaderos productos naturales producidos por las bacterias de manera selectiva. Paso seguido se verificó para cada una de las 46 señales que el ión inicialmente observado correspondía realmente al ión  $[M+H]^+$ .

Aunque el proceso de selección del ión molecular no es fácil, éste se hizo teniendo en cuenta las siguientes consideraciones (Ardrey, 2003): i) la técnica de ionización fue APCI y ésta favorece la formación de especies moleculares con muy poca fragmentación, ii) Se añadió a la fase móvil el modificador ácido fórmico, el cual ayuda a la protonación de las especies moleculares, favoreciendo la formación de iones  $[M+H]^+$  intensos, iii) Luego de seleccionar alguno de los iones presentes en el espectro como ión molecular, se buscaron iones correspondientes a pérdidas lógicas o a iones aductos lógicos, entre ellos  $[M+H+Na]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+H+K]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+Na+K]^+$ ,  $[M+H+CH_3OH]^+$ ,  $[M+Na+CH_3OH]^+$ ,  $[M+HCOOH]^+$ , típicos en este tipo de análisis, iv) Se buscó la ayuda del software Xcalibur™ con la opción de hacer la reconstrucción de los cromatogramas de cada uno de los iones que no coincidie-

ran con pérdidas o aductos lógicos a partir del ión molecular seleccionado (RICs, por sus siglas en inglés de Reconstructed ion chromatograms), para descartar si eran productos del ruido de fondo, v) Se verificó que las pérdidas lógicas encontradas en el espectro de masas fueran congruentes con los iones de fragmentación encontrados en los espectros hijos del ión seleccionado como  $[M+H]^+$ . Si bien este análisis se hizo con la mayor rigurosidad, es importante aclarar que el ion seleccionado como  $[M+H]^+$ , mostrado en la Tabla 1, es solo aquel que mayor probabilidad tiene de serlo.

### Análisis por derreplicación usando Antibase 2007™

Para los 46 productos naturales detectados se realizó una búsqueda en la base de Datos Antibase 2007™ (contiene información espectroscópica de los diferentes compuestos aislados a partir de algas, microorganismos y hongos mayores incluyendo levaduras, ascomicetos, basidomicetos, y líquenes) de sustancias reportadas en la literatura con igual  $[M+H]^+$ , estableciendo en cada caso cuantos de esas reportes vienen de bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus*.

### Resultados y análisis de resultados

La detección e identificación rápida (*screening* químico) de los compuestos producidos por 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *P. elisabethae* se realizó utilizando una estrategia metodológica que involucra las siguientes etapas secuenciales: a) cultivo miniaturizado en placas de 24 pozos con un volumen de 5 ml b) extracción en fase sólida de los compuestos producidos en los cultivos c) Análisis por UPLC-MS de los extractos obtenidos en el paso b y d) Análisis por derreplicación de los productos detectados en los cultivos, usando la plataforma AntiBase 2007™. Con esta información se construyó una librería que consta de los productos de cultivo del conjunto de bacterias estudiadas en cuatro medios diferentes y la posterior identificación por derreplicación de algunas de las sustancias previamente reportadas, así como también una primera aproximación a la búsqueda de la mejor fuente y las mejores condiciones de cultivo para la producción de las sustancias presentes en la librería.

Cultivo miniaturizado de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes y extracción de los productos

La realización de 180 cultivos miniatura en paralelo (volumen de 5 ml en placas de 24 pozos) de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *P. elisabethae*, en cuatro medios diferentes por triplicado además del blan-

co de cultivo (medio sin inocular), permitió reducir significativamente el tiempo, gasto de reactivos y ahorro de esfuerzo. Adicionalmente, con el fin de maximizar la cantidad de sustancias adsorbidas una vez liberadas por las bacterias al medio, los cultivos se llevaron a cabo en presencia de la resina Diaion™ HP-20, un adsorbente poliaromático selectivo para compuestos hidrofóbicos (Li y Chase, 2010), que además los separa de las sales presentes en el medio; su principal ventaja frente a otras resinas es su gran área superficial (~500 m<sup>2</sup>/g) lo que le confiere una mayor capacidad de adsorción. Los rendimientos de extracción variaron dependiendo del medio de cultivo empleado, así para medios ricos en nutrientes, MB y TAK se obtuvieron rangos de cantidad de extracto entre 3-10 mg y 5-15 mg respectivamente, mientras que para los cultivos en medios bajos en nutrientes, NB/10 y MMB los rangos estuvieron entre 0-1 mg y 1-2 mg respectivamente.

En la fase del cultivo se manejó como única variable la composición del medio, usando dos ricos en nutrientes (MB y TAK) y dos bajos en nutrientes (MMB y NB/10) y se mantuvieron constantes factores tales como la temperatura y aireación (agitación). Es importante anotar que en nuestro diseño experimental, la selección del tiempo de incubación estuvo más encaminada a garantizar que el tiempo empleado fuera el necesario para que las bacterias llegaran a su fase exponencial de crecimiento (mayor rendimiento de productos), particularmente en los medios bajos de nutrientes (MMB y NB/10) donde se necesitó un mayor tiempo de incubación.

La extracción en fase sólida utilizada en esta aproximación metodológica permitió mayores rendimientos y menores costos en el proceso total, debido a que los compuestos de interés fueron retenidos selectivamente en la resina. Al comparar esta metodología con la que utiliza extracción con solventes se evidencia que en esta última son necesarios pasos adicionales para eliminar impurezas tales como sales y componentes del medio de cultivo.

Análisis de los compuestos presentes en los extractos de cultivo de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes usando UPLC-MS e identificación por derreplicación usando Antibase 2007™

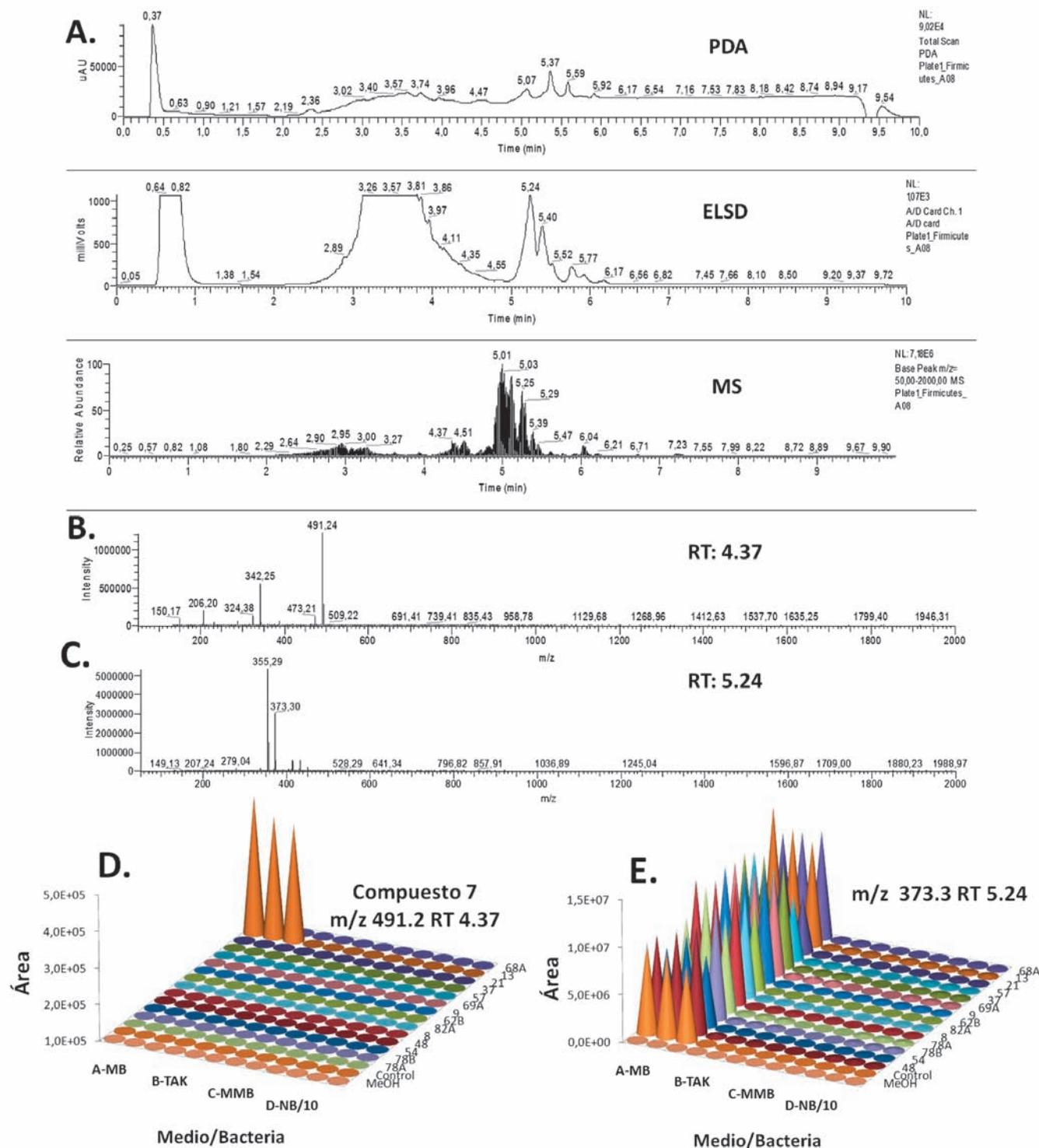
El análisis químico simultáneo a partir de extractos crudos de un número elevado de muestras sólo recientemente ha sido posible con el advenimiento de la tecnología UPLC-MS que permite el análisis de un gran número de muestras en un período corto, al tiempo que la sensibilidad y resolución de la técnica ha aumentado (Toyo'oka, 2008; Yao *et al.* 2010). Si bien, el proceso de preparación de medios, preinóculo y cultivo *per se*, implican varios días de traba-

jo, la inyección de las muestras y el análisis de los datos obtenidos por UPLC-MS es el paso crucial de esta metodología aunque su tiempo de análisis sea menor. Por ejemplo en este trabajo se pudo analizar por UPLC-MS una placa de 96 pozos en menos de un día empleando aproximadamente 10 min por muestra en el instrumento, esta rápida detección química de los productos de cultivo de las bacterias es uno de los mayores aportes realizados con este diseño experimental.

Una vez todos los cultivos fueron extraídos, los extractos fueron dispuestos en las placas de 96 pozos a una concentración entre 1-5 mg/ml usando como disolvente MeOH grado HPLC, a un volumen final de 1 ml y analizados por UPLC-MS, en una micro columna de alta resolución en fase reversa. Las separaciones fueron monitoreadas con dos detectores universales: ELSD y MS y un detector específico PDA para sustancias con grupos cromóforos en el rango de 200-600 nm. En total se analizaron 192 muestras (168 extractos de los cultivos de las 14 bacterias en cuatro medios por triplicado más 12 extractos de los controles de los cuatro medios por triplicado y 12 blancos de solvente), un ejemplo particular de estos resultados se muestra en la Figura 1.

La Figura 1 muestra el análisis UPLC-MS de los productos de cultivo de la bacteria *Bacillus firmus* (RKHC-13) en MB. Para claridad de presentación de resultados la Figura 1 está dividida en cinco secciones: **1A**: muestra el perfil cromatográfico del extracto de los productos de cultivo monitoreado por los tres detectores empleados PDA, ELSD y MS. **1B** y **1C**: Muestran los espectros de masas en modo APCI de los compuestos con tiempo de retención 4.37 min y 5.24 min, con [M+H]<sup>+</sup> en *m/z* 491.2 y 373.3, respectivamente. Finalmente en **1D** y **1E**: muestran las gráficas generadas por Xcalibur™ para estos dos compuestos, mostrando en el eje X los medios utilizados MB, TAK, MMB y NB/10 por triplicado, en el eje Y las 14 bacterias cultivadas junto con el control del medio sin inocular y MeOH como blanco de solvente y en el eje Z el área bajo la curva de la señal de la sustancia estudiada.

Cada una de las 192 muestras fue estudiada en búsqueda de los productos de cultivo de las bacterias, en la manera descrita anteriormente. Así, se pudieron detectar 593 compuestos en total, sin embargo, para verificar que éstos correspondían realmente a sustancias producidas selectivamente por las bacterias, se generó la librería de los compuestos producidos por las bacterias del *phylum* Firmicutes a través del software Xcalibur™, teniendo en cuenta el tiempo de retención y el ión [M+H]<sup>+</sup> de cada uno de los compuestos detectados. Una vez generada dicha librería,



**Figura 1.** Análisis UPLC-MS de los productos de cultivo de la bacteria *Bacillus firmus* (RKHC-13) en MB. **1A:** Perfil cromatográfico (detectores PDA, ELSD y MS) de los productos de cultivo. **1B:** Espectro de masas en modo APCI del compuesto 7 con tiempo de retención 4.37 min con un ión  $[M+H]^+$  en  $m/z$  491.2. **1C:** Espectro de masas en modo APCI del compuesto con tiempo de retención 5.24 min con un ión  $[M+H]^+$  en  $m/z$  373.3. **1D:** Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la cantidad de sustancia 7 con tiempo de retención 4.37 min con un ión  $[M+H]^+$  en  $m/z$  491.2. **1E:** Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la cantidad de sustancia con tiempo de retención 5.24 min con un ión  $[M+H]^+$  en  $m/z$  373.3. Medios n=3, Bacterias: 14 cepas junto con el control del medio sin inocular y MeOH como blanco de solvente.

el software es capaz de buscar en todos los cromatogramas la presencia de cada señal a través de la detección del ion  $[M+H]^+$  con un tiempo de retención determinado, de manera cuantitativa a través de la medición del área bajo la curva de la señal en los cromatogramas, permitiendo al usuario visualizar de manera sencilla que bacteria y en qué condiciones son producidos cada uno de los 593 compuestos.

La Figura 1D muestra cómo la sustancia 7 con tiempo de retención 4.37 min con  $[M+H]^+$  en  $m/z$  491.2 es producida únicamente por la bacteria *B. firmus* (RKHC-13) en medio MB, mientras que la sustancia con tiempo de retención 5.24 min con  $[M+H]^+$  en  $m/z$  373.3 (Figura 1E) fue detectada en todos los extractos de todos los cultivos en MB de las 14 bacterias así como también en el extracto del control del medio, pero no en los blancos de solvente ni en los extractos de los cultivos realizados en otros medios, indicando que esta sustancia corresponde a un componente del medio MB.

Al analizar cada una de las 593 gráficas generadas por el software Xcalibur™, se logró determinar cuáles sustancias corresponden a componentes del medio (gráficas similares a la Figura 1E) y cuales corresponden a sustancias producidas selectivamente por las bacterias (gráficas similares a la Figura 1D) logrando detectar en total 46 diferentes productos naturales.

La Tabla 1 muestra la librería de compuestos detectados como productos de cultivo de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses aisladas del octocoral *P. elisabethae*, mostrando en cada caso, su tiempo de retención, el ión  $[M+H]^+$ , la bacteria o bacterias que producen dicho compuesto y el medio o medios en que fue producido. Adicionalmente, para cada una de las sustancias detectadas se realizó la búsqueda de su ión  $[M+H]^+$  en la base de datos Antibase™ 2007, suministrando para cada sustancia el número total de compuestos reportados en la literatura y el número de compuestos reportados para los géneros *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus* con igual ión  $[M+H]^+$ , sin considerar el tiempo de retención como criterio de acotamiento. Es importante aclarar que la búsqueda se puede realizar con otros iones pseudomoleculares o aductos tales como  $[M-H]^-$  y  $[M+Na]^+$  de los compuestos de origen microbiano.

Para la mayoría de las sustancias presentes en la librería existen más de 10 compuestos en total reportados con el mismo ión  $[M+H]^+$ , por esta razón llegar a aseverar cuál de esos compuestos corresponde a cada una de las sustancias detectadas con la información hasta este punto es una tarea imposible. Sin embargo, de acuerdo a estudios previos de bacterias del mismo género y revisando la bi-

bliografía se puede llegar a una primera aproximación acerca de la estructura de la sustancia o del tipo de sustancia detectada. Un ejemplo, es el caso de la sustancia 5 detectada como producto en los cultivos de las bacterias *Bacillus pumilus* (RKHC-57) y *Bacillus mojavensis* (RKHC-37) en MB, TAK y NB/10, que presenta un ión  $[M+H]^+$  en  $m/z$  425.3, para la cual hay reportados en total 99 compuestos, pero de ellos solo 2 han sido aislados a partir de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* y específicamente uno de ellos la amicoumacina B (Figura 2) fue aislada previamente del cultivo en MB de la cepa *B. pumilus* (SP21), encontrada en sedimentos recolectados en Las Bahamas (Berrue *et al.* 2009). De acuerdo a lo anterior y teniendo en cuenta que la sustancia 5 fue detectada en nuestra cepa *B. pumillus* (RKHC-57) podríamos sugerir que ésta corresponde a la amicoumacina B.

De esta manera sugerimos la estructura para 10 de los 46 compuestos (Figura 2) encontrados en nuestra librería, no obstante vale la pena aclarar que hasta no realizar la comparación con patrones de referencia, y el escalamiento y posterior aislamiento e identificación de dichas sustancias no se llegará a la identificación inequívoca de las mismas. Trabajos en esta dirección están siendo llevados a cabo en nuestro laboratorio. Sin embargo, esta primera aproximación se convierte en una ventaja ingente en la identificación preliminar del tipo de sustancias que son producidas por cada una de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes estudiadas y qué medios de cultivo favorecen la producción de las mismas.

Otra ventaja de construir este tipo de librerías, es conocer bajo qué condiciones son producidas las sustancias presentes en ella. Un par de ejemplos se presentan en la Figura 3. El primero se refiere a la producción del compuesto 16 con tiempo de retención de 5.74 min con un ion  $[M+H]^+$  en  $m/z$  853.4, el cual es producido únicamente por la bacteria *B. pumillus* (RKHC-57) en los medios MB, TAK y NB/10, siendo mayor su producción en medio MB y NB/10 (Figura 3A). Al parecer, la producción de este metabolito no depende de la cantidad de nutrientes presentes en el medio, debido a que fue producido en un medio con baja concentración de nutrientes como NB/10, por el contrario su producción si dependerá de que tan fácilmente sean digeridas sus fuente de carbono, en este caso los medios MB y NB/10 utilizan extracto de levadura y de carne respectivamente, mientras que TAK utiliza como fuente de carbono almidón soluble el cual es poco digerible. Adicionalmente, la adición de peptona es un factor crucial en la producción de la sustancia 16, debido a que ésta no fue detectada en el medio MMB que no contiene peptona (Figura 3A).

**Tabla 1.** Librería de compuestos detectados como productos de cultivo en los medios MB, TAK, MMB y NB/10 de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*.

Compuesto Nº	[M+H] <sup>+</sup> m/z	RT	<i>Bacillus</i>							<i>Oceanobacillus</i>		<i>Paenibacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>				Nº compuestos reportados en Antibase	
			21	68A	13	9	57	69 <sup>a</sup>	37	62B	82A	8	54	48	78A	78B	Totales <sup>a</sup>	Genero <sup>b</sup>
1	226.2	2.78				MMB										10	0	
2	226.2	3.15			MMB	MMB					MMB					10	0	
3	619.2	3.81		MB	MB	MB			MB TAK	MB TAK	TAK	TAK				46	0	
4	424.4	4.05						MB		MB						23	3	
5	425.3	4.13					MB MB TAK NB/10			MB MB TAK NB/10						99	2	
6	799.3	4.18									MB					9	0	
7	491.2	4.37			MB											29	0	
8	411.0	4.5	MB TAK	MB TAK												106	1	
9	256.2	4.98	MB TAK	MB TAK												15	0	
10	419.3	4.6	MB TAK NB/10	MB TAK NB/10						MB TAK NB/10		MB TAK NB/10				67	0	
11	419.2	4.75	MB TAK NB/10	MB TAK NB/10						MB TAK NB/10		MB TAK NB/10				67	0	
12	186.2	5.04						TAK NB/10		TAK NB/10						12	0	
13	274.4	5.31	MMB	MMB												14	0	
14	724.4	5.34							TAK							12	0	
15	478.2	5.55										MB				35	0	
16	853.4	5.74						MB TAK NB/10								18	0	
17	1036.6	5.76						MB		MB						15	10	
18	1080.6	5.76						MB		MB						6	0	
19	1050.6	5.83						MB								13	7	
20	1078.5	6.05						MB								11	0	
21	1072.8	5.86						MB NB/10								15	4	
22	737.6	5.89						MB								11	0	
23	758.6	6.07						MB TAK NB/10								15	0	
24	1036.6	6.16						MB MMB		MMB						15	10	
25	551.6	7.17					TAK			TAK						46	1	
26	537.4	7.53					TAK									43	0	
27	531.2	2.66	TAK	MB TAK	MB	MB				MB						74	0	
28	600.2	2.7	TAK	TAK						MB						20	0	
29	527.2	2.93	TAK	MB TAK	MB	MB			MB	MB						52	0	
30	222.2	3.89	MB TAK	MB TAK	MB	MB			MB	MB		MB				14	1	
31	543.3	3.59	TAK	TAK												19	1	
32	343.4	4.22	MB TAK	MB TAK	MB	MB			MB	MB		MB				89	1	
33	206.3	4.48	MB TAK NB/10	MB TAK NB/10	MB	MB			MB	MB		MB				16	0	
34	291.0	3.98							MB TAK					TAK	TAK	101	0	
35	308.1	3.98							MB TAK					TAK	TAK	27	0	
36	463.0	4.50							MB TAK				TAK	TAK	TAK	45	2	
37	463.2	4.29							MB TAK				TAK	TAK	TAK	45	2	
38	549.2	4.52							MB TAK				TAK	TAK	TAK	48	1	
39	549.0	4.65							MB TAK				TAK	TAK	TAK	48	1	
40	635.0	4.78							MB TAK				TAK	TAK	TAK	27	2	
41	721.0	4.91							MB TAK				TAK	TAK	TAK	8	0	
42	1065.0	5.11							MB TAK				TAK	TAK	TAK	8	7	
43	807.0	4.92							MB TAK				TAK	TAK	TAK	14	0	
44	675.3	5.12							TAK		TAK NB/10	TAK NB/10		NB/10	NB/10	NB/10	19	0
45	495.6	8.43	TAK	TAK					TAK		TAK	TAK		TAK	TAK	56	0	
46	1094.8	5.88						MB TAK NB/10			MB	MB		MB	MB	MB	7	0

<sup>a</sup>. Número total de compuestos reportados en la base de datos Antibase 2007.

<sup>b</sup>. Número de compuestos reportados para especies a los géneros *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus*. Medios de cultivo: MB: Caldo marino, TAK: Caldo Takashi, MMB: Caldo mínimo marino y NB/10: Caldo nutritivo dilución a diez.

Otro caso es el de sustancia **5** con tiempo de retención 4.13 min con un ion [M+H]<sup>+</sup> en m/z 425.3, la cual es producida por las bacterias *B. pumilus* (RKHC-57) y *B. mojavensis* (RKHC-37) en tres de los cuatro medios utilizados, siendo *B. pumillus* (RKHC-57) cultivada en MB donde mayor can-

tidad de sustancia fue detectada. Al parecer, la producción de este metabolito por *B. pumillus* (RKHC-57) al igual que en el ejemplo anterior no depende de la cantidad de nutrientes presentes en el medio y si de la adición de peptona en el medio de cultivo. Además, la adición de sa-

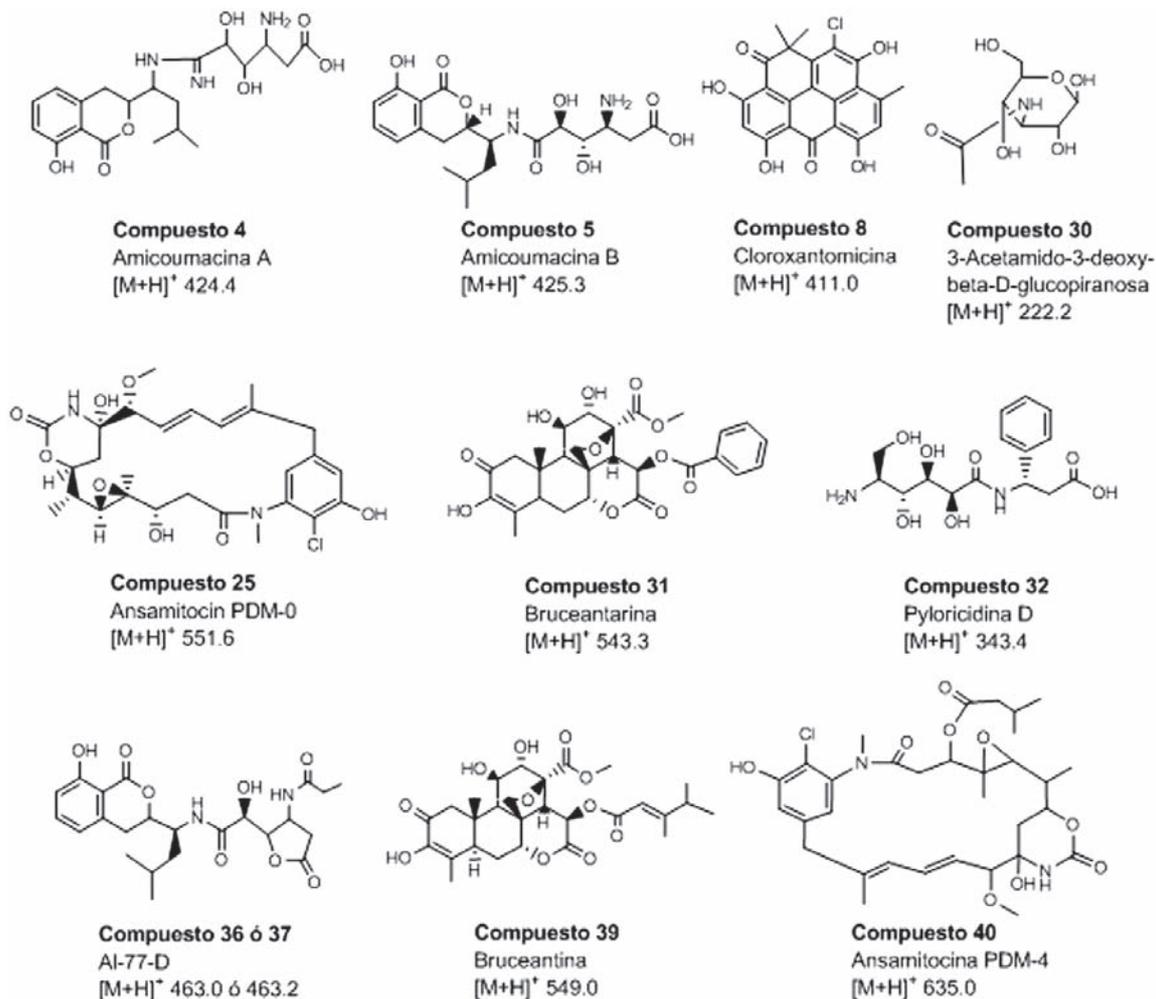


Figura 2. Estructuras propuestas para 10 de los compuestos encontrados en la librería de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbiotes del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*.

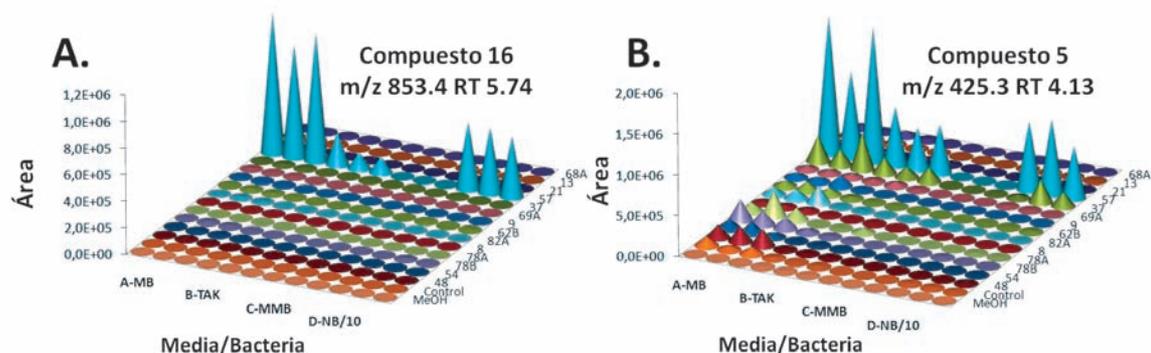


Figura 3. Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la producción selectiva de algunas sustancias presentes en la librería. A. Compuesto 16 con tiempo de retención 5.74 min y un ión [M+H]<sup>+</sup> en m/z 853.4 producido únicamente por la bacteria *Bacillus pumilus* (RKHC-57) en varios medios. B. Compuesto 5 con tiempo de retención 4.13 min con un ión [M+H]<sup>+</sup> en m/z 425.3 producido por las bacterias *Bacillus pumilus* (RKHC-57) y *Bacillus mojavensis* (RKHC-37) en varios medios. Medios n=3, Bacterias: 14 cepas junto con el control del medio sin inocular y MeOH como blanco de solvente.

les en el medio de nutrientes si pareciera afectar la producción de dicho metabolito, debido a que MB es un medio rico en sales en comparación al medio TAK (Figura 3B).

Como conclusión del presente trabajo vale la pena mencionar que la miniaturización de los cultivos en cuatro medios diferentes de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *P. elisabethae*, junto con la extracción en fase sólida y el uso de la tecnología de UPLC-MS como herramienta química para la detección rápida de compuestos producidos y de Antibase 2007<sup>TM</sup> como herramienta de derreplicación, se tradujo en altos rendimientos de análisis y en la generación de una librería, la cual permitió descartar los componentes o productos de descomposición de los medios de cultivo, además de detectar todos los compuestos producidos por todas las bacterias ensayadas y la posterior identificación de algunas de las sustancias, previamente reportadas, así como también el avanzar en el proceso de identificación de sustancias desconocidas. Otra de las grandes ventajas de la librería generada fue realizar una primera aproximación a la búsqueda de la mejor fuente y de las mejores condiciones de cultivo para la producción de las sustancias que componen nuestra librería. Esta información será muy útil en la selección racional de algunas de las bacterias y del medio de cultivo más conveniente para el posterior escalamiento del cultivo y aislamiento e identificación de los compuestos producidos usando los métodos cromatográficos y espectroscópicos comúnmente utilizados en productos naturales.

Así, los resultados mostrados en este trabajo se convierten en el punto de partida para la planeación del escalamiento a nivel de laboratorio y posteriormente a nivel industrial de estas sustancias a partir de las bacterias empleadas. Aunque en este momento no se ha determinado la actividad biológica de estos compuestos, la determinación de su potencial de aplicación si representa un área muy interesante por explorar.

Todos los resultados anteriores soportan la preferencia por el análisis preliminar de librerías por UPLC-MS, en comparación con el *screening* bioguiado, como herramienta para la detección temprana en los extractos de posibles sustancias con estructura química novedosa (en dado caso que no existieran reportes en la base de datos Antibase) y de sustancias conocidas, las cuales en un *screening* bioguiado requerirían de una alta inversión de tiempo y recursos para llegar a la identificación de las mismas.

Adicionalmente este artículo se constituye en un reporte importante acerca del empleo de aproximaciones metodológicas que permiten identificar compuestos en bacterias de manera simplificada, convirtiéndose así, en

consulta de primera mano para diferentes investigadores interesados en la producción de metabolitos a partir de microorganismos, quienes se ven enfrentados a la difícil tarea de realizar cultivos con gran cantidad de material y/o con bajos rendimientos hasta encontrar las mejores condiciones para la producción de determinada sustancia. Es por ello que este trabajo destaca desde el punto de vista biológico, el reducir los ensayos para probar varias condiciones que inducen la síntesis de compuestos en sistemas vivos y desde el punto de vista químico, el lograr en un tiempo corto una librería de compuestos para analizar y evaluar su potencial como sustancias con interés químico o potencial farmacológico.

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por Colciencias y la Universidad Nacional de Colombia. Los autores agradecen al Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial por el permiso para recolección de las muestras en la Isla de Providencia (SW Caribe) (permiso No. 4 of 10/02/2010). RK, FB, BH y HC agradecen el soporte financiero de Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC), Canada Research Chair Program, University of Prince Edward Island, Atlantic Innovation Fund, y Jeanne and Jean-Louis Lévesque Foundation.

### Bibliografía

- Ardrey RE.** 2003. Liquid chromatographic-mass spectrometry: An introduction. John Wiley & Sons Ltda. Chichester, England. ISBN: 0-471-49801-7.
- Berdy J.** 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 58:1-26.
- Berrue F, Ibrahim A, Boland P, Kerr R.** 2009. Newly isolated marine *Bacillus pumilus* (SP21). A source of novel lipoamides and other antimicrobial agents. *Pure Appl. Chem.* 81:1027-1031.
- Berrue F, Withers ST, Haltli B, Withers J, Kerr R.** 2011. Chemical screening method for the rapid identification of microbial sources of marine invertebrate-associated metabolites. *Mar Drugs* 9:369-381.
- Blunt JW, Copp BR, Munro HM, Northcote PT, Prinsep MR.** 2009. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 26:170-244.
- Blunt JW, Copp BR, Munro HM, Northcote PT, Prinsep MR.** 2011. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 28:196-268.
- Correa H, Valenzuela AL, Ospina LF, Duque C.** 2009. Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). *J Inflamm* 6:doi: 10.1186/1476-9255-6-5.
- Correa H, Aristizabal F, Duque F, Kerr R.** 2011a. Cytotoxic and antimicrobial activity of pseudopterins and seco-

- pseudopterins isolated from the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* of San Andrés and Providencia Islands (Southwest Caribbean Sea). *Mar Drugs* 9:334-344.
- Correa H, Haldi B, Duque C, Kerr R.** 2011b. Bacterial community associated with the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at Providencia Island (SW Caribbean sea). En preparación.
- Duque C, Puyana M, Narvaez G, Paz A, Osorno O, Hara N, Fujimoto Y.** 2004. Pseudopterins P-V. New compounds from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* from Providencia Island, Colombian Caribbean. *Tetrahedron* 60:10627-10635.
- Duque C, Puyana M, Castellanos L, Arias A, Correa H, Osorno O, Asai T, Hara N, Fujimoto Y.** 2006. Further studies on the constituents of gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected in San Andrés and Providencia islands, Colombian Caribbean: isolation of a putative biosynthetic intermediate leading to erogorgiane. *Tetrahedron* 62:4205-4213.
- Egan S, Thomas T, Kjelleberg S.** 2008. Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Curr Opin Microbiol* 11:219-225.
- Flatt P, Gautschi J, Thacker R, Musafija-Girt M, Crews P, Gerwick W.** 2005. Identification of the cellular site of polychlorinated peptide biosynthesis in the marine sponge *Dysidea (Lamellodysidea) herbacea* and symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongeliae* by CARD-FISH analysis. *Mar Biol* 147:761-774.
- Heckrodt TJ, Mulzer J.** 2005. Marine natural products from *Pseudopterogorgia elisabethae*: structures, biosynthesis, pharmacology, and total synthesis. In *Natural products synthesis II*. Volumen 244. 1st edition. Edited by Mulzer J. New York: Springer Berlin Heidelberg 1-41.
- Hildebrand M, Waggoner LE, Lim GE, Sharp KH, Ridley CP, Haygood MG.** 2004. Approaches to identify, clone, and express symbiont bioactive metabolite genes. *Nat Prod Rep* 21:122-142.
- Hill RT, Enticknap JJ, Peraud O, Anderson MA, Kasanah N, Rao KV, Bowling JJ, Hamann MT.** 2007. Microbial symbionts of marine invertebrates: Implications for drug discovery. Conference Programme and Proceedings. Manapro XII, Auckland, New Zealand.
- Ito T, Odake T, Katoh H, Yamaguchi Y, Aoki M.** 2011. High-Throughput profiling of microbial extracts. *J Nat Prod* 74:983-988.
- Li J, Chase HW.** 2010. Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources. *Nat Prod Rep* 27:1493-1510.
- Marrero J, Rodriguez II, Rodriguez AD.** 2010. The natural products chemistry of the gorgonian genus *Pseudopterogorgia* (Octocorallia:Gorgoniidae). In *Comprehensive natural products II: chemistry and biology*. 1st edition. Edited by Mander L, Liu H-W. Oxford: Elsevier, p. 363-428.
- Mayer AMS, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, McIntosh JM, Newman DJ, Potts B, Shuster DE.** 2010. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol Sci* 31:255-265.
- Mouchka ME, Hewson I, Harvell CD.** 2010. Coral-associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts. *Integr Comp Biol* 50:662-674.
- Mydlarz LD, McGinty ES, Harvell CD.** 2010. What are the physiological and immunological responses of coral to climate warming and disease?. *J Exp Biol* 213:934-945.
- Newman D, Hill R.** 2006. New drugs from marine microbes: the tide is turning. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:539-544.
- Penesyan A, Kjelleberg S, Egan S.** 2010. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Mar Drugs* 8:438-459.
- Piel J.** 2006. Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. *Curr Med Chem* 13:39-50.
- Ridley CP, Bergquist PR, Harper MK, Faulkner DJ, Hooper JNA, Haygood MG.** 2005. Speciation and biosynthetic variation in four dictyoceratid sponges and their cyanobacterial symbiont *Oscillatoria spongeliae*. *Chem Biol* 12:397-406.
- Sudek S, Lopanik NB, Waggoner LE, Hildebrand M, Anderson C, Liu H, Patel A, Sherman DH, Haygood MG.** 2007. Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from "Candidatus *Endobugula sertula*", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *J Nat Prod* 70:67-74.
- Toyo'oka T.** 2008. Determination methods for biologically active compounds by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry: application to the analyses of pharmaceuticals, foods, plants, environments, metabolomics, and metabolomics. *J Chromatogr Sci* 46:233-247.
- Yao S, Wu T, Li X, Tu B, Song H.** 2010. Ten years of research into phytomedicines analysis-an era in new technologies and methods. *Curr Pharm Anal* 6:269-288.

Recibido: agosto 7 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.

# ACTIVIDAD MICROBIANA EN SUELOS Y SEDIMENTOS EN EL SISTEMA CÓRDOBA JUAN AMARILLO, BOGOTÁ D.C.

Laura Emilia Cerón Rincón<sup>1</sup>, Eduardo Ramírez Valencia<sup>2</sup>

## Resumen

**Cerón Rincón, L.E., E. Ramírez Valencia:** Actividad microbiana en suelos y sedimentos en el sistema Córdoba Juan Amarillo, Bogotá D.C. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **35** (136): 349-361, 2011. ISSN 0370-3908.

Las cuencas hidrográficas en Bogotá D.C. son complejos sistemas ambientales que han sufrido graves alteraciones dadas por la urbanización, la actividad agrícola y ganadera y actividades industriales. El objetivo de este estudio fue comparar el estado de dos cuencas urbanas en Bogotá D. C. en el sistema Córdoba - Juan Amarillo, a través de algunos indicadores de salud y calidad de suelos, las actividades enzimáticas: deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y o-difenol oxidasa y las fracciones de carbono activo, para evaluar su condición. Se recomienda el uso de dichas actividades como parámetro de evaluación en programas de manejo ambiental para el sistema.

**Palabras clave:** humedales, contaminación, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, deshidrogenasa, o-difenol oxidasa y carbono activo.

## Abstract

The river basins of Bogotá D.C. are environmentally complex systems which have suffered serious alterations by urbanization, agricultural, livestock and industrial activities. The purpose of this study was to compare the status of two urban river basins in Bogotá D.C. for the Córdoba - Juan Amarillo system, through soil health and quality index, the enzymatic activities (dehydrogenase, alkaline phosphatase, acid phosphatase, and o-diphenoloxidase) and active carbon fractions. The use of such activities as evaluation parameters for the environmental management program for the system is recommended.

**Key words:** wetland, pollution, acid phosphatase, alkaline phosphatase, dehydrogenase, o-diphenoloxidase and active carbon.

<sup>1</sup> Docente de Cátedra. Correo electrónico: lceron2.d@correo.ean.edu.co

<sup>2</sup> Director Departamento de Ciencias Básicas Universidad EAN. Correo electrónico: eramirez@ean.edu.co

## Introducción

Los humedales son ecosistemas intermedios entre el medio acuático y el terrestre, caracterizados por porciones húmedas, semi-húmedas y secas de gran importancia, dado que retienen el agua que en épocas de lluvias, reservándola para las temporadas secas, regulando así los efectos perjudiciales de las crecientes de los ríos y de las inundaciones. Aún cuando los humedales ocupan sólo entre 4-6% de la superficie terrestre, ellos poseen un papel importante en el ciclo de carbono (Hernández, 2010) y de otros nutrientes en el planeta.

El sistema hídrico de Bogotá D.C. está formado por más de 200 cuerpos de agua, entre humedales, quebradas y canales, que hacen parte del sistema de drenaje pluvial de la ciudad. El Acuerdo 6 de 1990, el acuerdo 19 del 1994 y el acuerdo 27 de 1995 designan los humedales de Bogotá (DAMA, 2006) como Áreas Protegidas y Reservas Naturales. Los humedales están incluidos dentro de la categoría de ecosistemas estratégicos al igual que las áreas verdes que están dentro del perímetro urbano. Sin embargo, el

crecimiento poblacional de la ciudad ha determinado una progresiva la intervención del territorio, colocando sus aguas al servicio del crecimiento urbano y aun no existe claridad frente al tipo de manejo que se les darán (Palacio *et al.* 2003) ya que, prevalecen aspectos que les dan una integración más urbana que ecológica. El carácter de Áreas Protegidas que tienen los humedales y el hecho de pertenecer a la Estructura Ecológica Principal del Distrito, deberían ser razones suficientes (Castaño, 2002) para evitar convertirlos en parques urbanos y que se continúe utilizándolos como parte del sistema de alcantarillado de la ciudad. En la localidad de Suba se encuentran algunos de los ecosistemas más importantes de la ciudad, como son los humedales de La Conejera, Juan Amarillo, Córdoba y Guaymaral. Este trabajo se desarrolló en el Sistema Córdoba - Juan Amarillo (Figura 1) el humedal de Córdoba está funcionalmente relacionado con el Humedal Juan Amarillo (DAMA, 2010) dado que hace parte del mismo sistema biofísico. El humedal Córdoba en la actualidad se encuentra fragmentado en 3 partes, está conectado con el “Parque Urbano Canal Córdoba” y “Parque Metropolitano Canal de los Molinos”, continúa al occidente con el lago

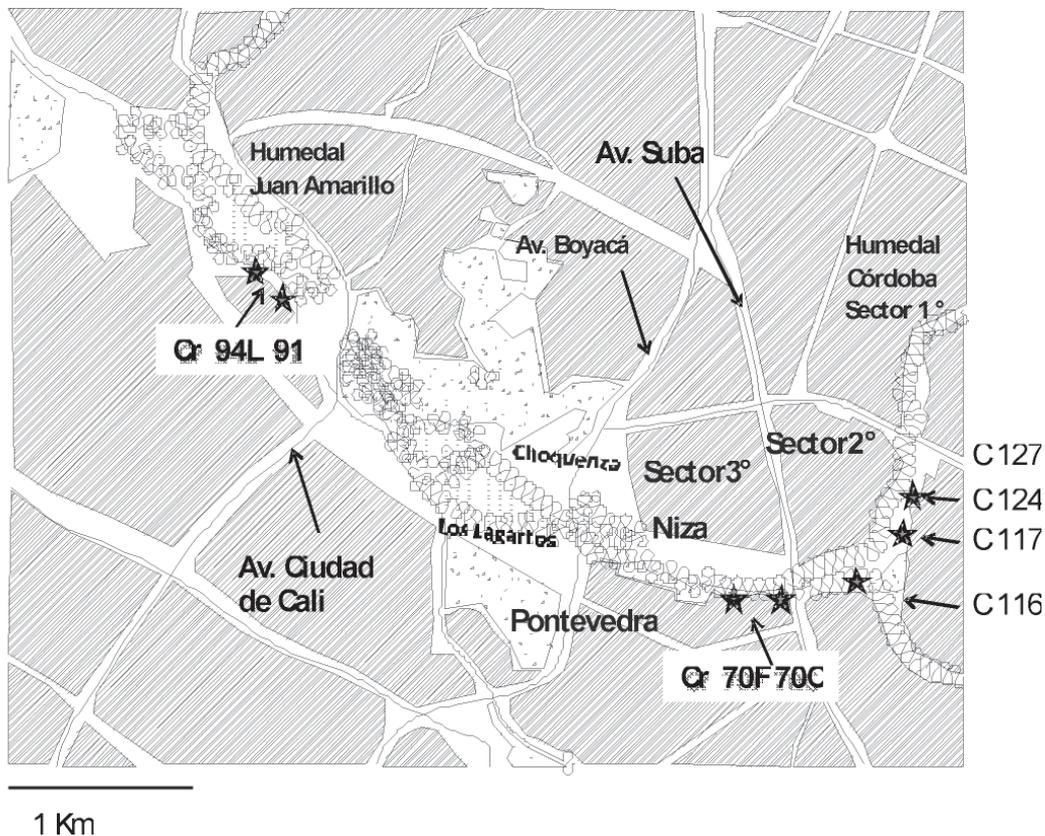


Figura 1. Lugar de Estudio Sistema Córdoba – Juan Amarillo. Los puntos de muestreo se indican con estrellas.

del Club Choquenzá, Los Lagartos y el Humedal Juan Amarillo o Tibabuyes, formando el Sistema Córdoba – Juan Amarillo. El humedal de Juan Amarillo, también llamado Laguna de Tibabuyes está dentro del área inundable de los ríos Bogotá y Juan Amarillo, los que junto con el humedal forman parte de la estructura primaria del sistema hídrico de la ciudad, fue declarado como Parque Ecológico Distrital de Humedal en 2004 y es el humedal más grande que tiene la capital del país. Su principal función es de amortiguación, que consiste en la retención de gran parte de los sedimentos de la sub-cuenca del Humedal de Córdoba, que hace parte de la cuenca del Río Juan Amarillo.

Con el desarrollo de la civilización los factores antropogénicos han tomado el papel principal en los cambios que pueden sufrir los ecosistemas, por ello se requiere definir cómo y en qué intensidad los afectan, las investigaciones en torno al tema hacen parte de los esfuerzos para enmarcar un manejo sostenible de los recursos (Cerón & Melgarejo, 2005) que asegure su conservación. Recientemente (Kang & Stanley, 2005) se le ha prestado atención a la conservación de las planicies inundables a lo largo de los ríos, dada su importancia en el mejoramiento de la calidad del agua y por la biodiversidad que soportan, dichas planicies y los suelos en general constituyen el hábitat de muchos organismos que colectivamente contribuyen a una gran variedad de bienes y servicios ambientales (Kibblewhite *et al.* 2008) resultado de funciones tan importantes como filtrar, amortiguar y transformar la materia, para proteger el ambiente y los nacimientos de agua de la contaminación (Doran, 2002; Doran & Zeiss, 2000). Son pocos los estudios a nivel global y nacional en torno a la canalización de ríos y humedales y su impacto en los procesos de los ecosistemas y degradación de los recursos naturales, las principales causas de degradación y reducción de la productividad de los suelos están relacionadas directamente con manejos inadecuados y la contaminación accidental o deliberada (Gianfreda *et al.* 2005) con desechos domésticos e industriales. Para evaluar el impacto de los contaminantes y el potencial remediador del ecosistema, se hace necesario contar con medidas relacionadas con el estado metabólico de la comunidad que lo habita. Las actividades enzimáticas del suelo se han sugerido como potenciales dentro de un conjunto de indicadores de salud y calidad, debido a su relación con la biología del suelo, ya que su presencia depende directamente de su continua liberación al ambiente, llevada a cabo principalmente (Caldwell, 2005; Burns, 1982) por la actividad microbiana, son sensibles a los cambios generados por contaminación y están relacionadas directamente con la remediación de contaminantes y con otros factores (Dick & Tabatabai, 1992) biológicos, químicos y físicos.

La actividad fosfatasa cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfato, liberando los grupos fosfato que estén en enlazados a sustratos más complejos como la materia orgánica del suelo, siendo así las responsables de la mineralización del fósforo orgánico en forma de fósforo inorgánico el cual queda disponible para los requerimientos de microorganismos y plantas. Esta actividad se clasifica en ácida (pH 6.5) o alcalina (pH 11) según su pH óptimo. Las fosfatasas ácidas se derivan tanto de plantas como de microorganismos, mientras que las alcalinas se derivan principalmente de microorganismos. La actividad deshidrogenasa refleja el trabajo de un grupo de enzimas intracelulares que están presentes en la microbiota del suelo, estas hacen parte de las reacciones metabólicas involucradas en la transferencia oxidativa de energía y son consideradas un buen indicador de la actividad microbiana además de ser sensibles a la degradación del suelo también se ven afectadas por los cambios estacionales. Existen evidencias (Doi & Ranamukhaarachchi, 2009) para considerar la actividad deshidrogenasa como indicador de la condición de los suelos (degradación o rehabilitación) y de cambios estacionales de lluvias/sequías. Se ha demostrado (Perucci *et al.* 2000) la importancia de los productos ácidos y fenólicos liberados durante la hidrólisis microbiana de sustancias que están presentes en los suelos naturalmente como residuos vegetales y orgánicos y de compuestos sintéticos como residuos industriales y plaguicidas, en la formación de las sustancias húmicas. Los productos fenólicos son generalmente inestables y están sujetos a la conversión oxidativa mediante reacciones abióticas o catalizadas por enzimas oxidativas, a quinonas las cuales polimerizan a macromoléculas semejantes al humus. Los compuestos fenólicos en el suelo se transforman por procesos oxidativos principalmente catalizados por fenolasas y peroxidasas que provienen de la microbiota presente en el suelo. El carbono orgánico del suelo (COS) naturalmente varía a través del paisaje, los tipos del suelo y zonas climáticas. Se caracteriza por altos niveles de C en formas recalcitrantes o humificadas. Pequeños cambios en el COS como resultado de manejo de los suelos son difíciles de medir, pero pueden tener efectos pronunciados sobre el comportamiento del suelo y los procesos microbianos. Sin embargo la detección de cambios en la fracción pequeña y relativamente lábil de COS, proporciona un indicador de una posible degradación o mejoramiento como consecuencia de prácticas de manejo. Dicha fracción es el combustible de la cadena alimenticia entonces posee una gran influencia en los ciclos de los nutrientes y en muchas de las propiedades biológicas de los suelos, por lo que se denomina una fracción activa a diferencia del carbono orgánico total el cual es fuente de

un carbono pasivo o altamente recalcitrante. La fracción activa de carbono sirve como indicador de calidad sensible a los cambios inducidos por el manejo, incluye: el carbono microbiano, la materia orgánica particulada y los carbohidratos del suelo.

Dado lo anterior se propone comparar en términos de indicadores de salud y calidad de suelos y sedimentos del Sistema Córdoba - Juan Amarillo (Figura 1) ubicado en la localidad de Suba Bogotá D. C; que permitan estimar el estado de las cuencas, su contribución a la salud ambiental de la ciudad y que puedan servir para el monitoreo de los recursos.

### Materiales y métodos

**Lugar de estudio.** El humedal Córdoba (Figura 1) se encuentra localizado entre las calles 116 y 127 y entre las avenidas Córdoba y Boyacá. Como se mencionó se encuentra fragmentado en tres partes, el primer cuerpo fue separado por la Avenida 127 y se encuentra al norte de esta. El segundo cuerpo está separado por las avenidas 127 y Suba. El tercero se localiza entre las avenidas Suba y Boyacá. Según el plan de manejo del Humedal Córdoba (DAMA, 2008) la problemática ambiental del Parque Ecológico Distrital humedal Córdoba se resume así: Compromiso de la Calidad de agua afectada por aportes de aguas residuales, existen cuatro vertimientos directos de aguas negras en el sector medio del humedal, ubicados frente al sector del barrio Niza Antigua y otros cuatro ubicados frente al barrio Pontevedra hacia la avenida Suba. Estructuras hidráulicas deficientes originando restricciones al flujo de agua, desconexión hídrica y ecológica del humedal con la Estructura Ecológica Principal y acumulación de basuras y escombros en zonas del humedal. Pastoreo de animales, presencia de animales domésticos y otros depredadores. Desarrollo de usos no compatibles o permitidos al interior de la Zona de Manejo y Preservación Ambiental del humedal. Incompatibilidad de algunas actividades urbanas contiguas, respecto a las expectativas de conservación y manejo del humedal. Depredación de la fauna silvestre por parte de perros y gatos (callejeros y domésticos) que atacan las aves, especialmente a las tinguas. Podas inadecuadas en las zonas de ronda, que generan pérdida de cobertura vegetal. Dado lo anterior en el marco del conflicto ambiental generado en torno a las intervenciones para la recuperación del humedal, se presentó una Acción Popular (No. 254 de 2000) dentro de la cual actualmente (DAMA, 2008) se realiza un ejercicio de concertación pública, entre el Distrito y la comunidad y existe una Resolución Defensorial (No. 018 de 2003) con lo que mejoraron algunas de las problemáticas del Humedal.

En el Río Juan Amarillo (Figura 1) el humedal se comporta como una trampa de sedimentos entrando 3400 mg/l de sólidos totales, de los cuales se han detectado a la salida 1320 mg/l, lo que quiere decir que en alguna parte del cauce o derivado de lo que rebosa del humedal, se están quedando 2170 mg/l, que equivalen al 62,2% de los sólidos transportados por el río. Adicionalmente las descargas de aguas de origen doméstico provenientes del barrio el Rosal de Suba, que llegan al caño Juan Amarillo en el sector Aures. Entre los años 60 y 70 se desvió del cauce del Río Juan Amarillo, mediante la construcción de un jarillón, lo cual contribuyó a su desecación y reducción de volumen de agua y a la reducción de la superficie del humedal, asociada al relleno y desecación del humedal para construcción de vivienda y vías. Todas las aguas negras de esta gran cuenca, que se inicia en los Cerros Orientales y de sus alrededores, van a parar al Juan Amarillo (DAMA, 2010). Muchos de los asentamientos subnormales, se muestran carentes de servicios de alcantarillado, evacuando sus aguas residuales directamente sobre el humedal. El sector del barrio Lisboa se encuentra por debajo del nivel de las aguas del humedal y bombea sus aguas negras hacia el humedal, permaneciendo los pozos sépticos a cielo abierto y convirtiéndose en la causa de que afectan principalmente a la población infantil.

**Toma de muestras:** Se definieron dos lugares de estudio donde se tomaron muestras de suelos y sedimentos en marzo de 2011, época en la que se tubo la mayor precipitación 180 mm registrada hasta el momento en Bogotá, D.C. En el Humedal de Córdoba (4° 42' 13.4" N, 74° 3' 59.7" W) se tomaron muestras en el segundo y tercer sector del humedal (Figura 1) para un total de 5 puntos de muestreo, 3 puntos en el segundo sector paralelos a la Avenida Córdoba entre calles 116 y 124 y en el tercer sector del humedal pasando la avenida suba, paralelos a la calle 117 se tomaron 2 puntos entre las Carreras 70C y 70F. Para el Río Juan Amarillo (4° 43' 49.79" N, 74° 6' 34.9" W) se tomaron muestras a la altura del Humedal Juan Amarillo en 2 puntos de muestreo (Figura 1) paralelo a la calle 98 entre las carreras 91 y 94L.

Las muestras de suelos se tomaron a una profundidad entre 5 y 10 cm y las de sedimentos se tomaron superficiales entre 0 a 5 cm, en cada lugar de muestreo se tomaron nueve muestras en un esquema en W. Las muestras transportaron en bolsas y refrigeradas hasta el laboratorio, donde se reunieron al azar en tres grupos, para obtener tres replicas (muestras compuestas) por cada punto de muestreo. Las muestras compuestas de suelos y sedimentos se homogeneizaron y pasaron por tamiz (2 mm) para disgregarlas, enseguida se almacenaron a -20°C. Se realizó

determinación del contenido de agua de cada una de las muestras compuestas, por diferencia de peso antes y después de secarlas en horno a 72°C por 48 horas.

**Determinación del pH de agua y suelos.** Se realizó una sola determinación por lugar de muestreo usando método potenciométrico, para suelos por suspensión del suelo en agua destilada en una relación (p:v) 1:2.5; las muestras de agua se tomaron superficiales.

**Determinación de actividades enzimáticas y fracciones de carbono activo.** Se determinaron las actividades deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) y fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2) en los suelos y sedimentos, la actividad difenol oxidasa (EC 1.10.3.1) se determinó en los suelos y las fracciones de carbono activo se determinaron en los suelos y sedimentos; todas las medidas se realizaron por duplicado, a cada una de las tres replicas (muestras compuestas) obtenidas por lugar de muestreo, desarrollando los métodos que se describen a continuación:

**Actividad deshidrogenasa (EC 1.1.1.1).** Se determinó de acuerdo al método de Casida *et al.* (1964) el ensayo enzimático se basa en la determinación de trifeníl formazan TPF formado por la actividad a partir de la reducción cloruro de trifeníl tetrazolio TTC, este último sirve como aceptor de electrones para varias deshidrogenasas. La muestra de suelo se incubó en buffer Tris-HCl 100 mM pH 7,8 con el sustrato, por 24 horas a 30°C en agitación, el trifeníl formazán producto de la actividad se extrajo en acetona y se determinó colorimétricamente a 546 nm, la actividad se expresó en  $\mu\text{g}$  de TPF/g suelo seco\*h.

**Actividades fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) y ácida (EC 3.1.3.2)** se determinaron por el método reportado por Eivazi & Tabatabai (1977) y modificado por Tabatabai (1982) el ensayo enzimático, se basa en la determinación de *p*-nitrofenol liberado por la enzima a partir de sustrato *p*-nitrofenilfosfato, el sustrato se incubó con la muestra de suelo 1 h a 37°C en buffer de trabajo pH 6,5 para determinar fosfatasa ácida y en buffer de trabajo pH 11 para determinar fosfatasa alcalina. El *p*-nitrofenol liberado por actividad se extrajo en medio alcalino y se determinó colorimétricamente a 400 nm. Las sustancias húmicas disueltas incrementan en medio alcalino y pueden interferir con la determinación de *p*-nitrofenol; por ello, se adicionó cloruro de calcio a las muestras para evitar dispersión de minerales de arcilla. La actividad se expresó en  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol/g suelo seco\*h.

**Actividad o-difenol oxidasa (EC 1.10.3.1)** se determinó por el método reportado por Perucci *et al.* (2000) el problema más importante en el estudio de la oxidación de los

compuestos fenólicos en los suelos, es la baja disponibilidad del sustrato oxidado causado por la sorción de los componentes de suelo en la interface con la catálisis enzimática, dado que se dan reacciones inmediatamente después del contacto del catecol con el suelo. Las quinonas formadas por la oxidación de compuestos fenólicos son altamente reactivas y capaces de formar varios productos de condensación, especialmente en presencia de compuestos con grupos amino libres, este método se basa en la formación de dichos compuestos, a través de la desarrollo de la oxidación enzimática del catecol y posterior reacción con la prolina, usando la determinación colorimétrica a 525 nm. Los reactivos se disolvieron en buffer fosfatos 0.1M pH 6.5, se agitaron vigorosamente por 3 minutos para su oxigenación y que se incubaron con la muestra de suelo por 10 minutos a 30°C. La actividad se expresó en  $\mu\text{mol}$  catecol oxidado/g suelo seco\*h.

**Fracciones de carbono activo:** se determinó por el método de Blair *et al.* (1995) modificado por Weil *et al.* (2003) que se basa en la determinación del carbono oxidable en presencia de permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ), la muestra de suelo se suspendió en solución de  $\text{KMnO}_4$  0.2M en  $\text{CaCl}_2$  1M (pH 7.2), se agitó por 5 minutos a temperatura ambiente, se midió absorbancia a 565 nm. La pérdida de color del reactivo es proporcional es proporcional a la cantidad de carbono oxidable en los suelos. La cantidad de carbono activo se expresó en mg C/Kg suelo seco.

**Análisis estadísticos.** Se realizaron pruebas de análisis de varianza de una vía ( $p < 0,05$ ) para comparar en efecto sobre las actividades enzimáticas y fracciones activas de carbono, por los diferentes lugares de muestreo. Para los análisis que resultaron significativos, se determinaron las diferencias entre las medias por mínima diferencia significativa. Los análisis se realizaron utilizando el software estadístico SPSS 17.0.

## Resultados y discusión

**pH de suelos y aguas.** Se observó que a medida que el sistema está más intervenido incrementa el pH (Tabla 1) tanto en suelos y aguas. En el segundo sector del Humedal Córdoba se encuentra mas diversidad de vegetación acuática y terrestre, particularmente en los suelos aledaños al humedal a la altura de la calles 124-117 se encuentran arbustos de pino cuyas hojas en el suelo forman una capa de mantillo de agujas de pino, mientras que en el tercer sector (Cr 70-70F) donde se realizaron los muestreos se encuentran algunos arboles rodeados principalmente por los pastos "grama gruesa" (*Pennisetum clandestinum*). El pH determinado en las aguas y suelos aledaños al río

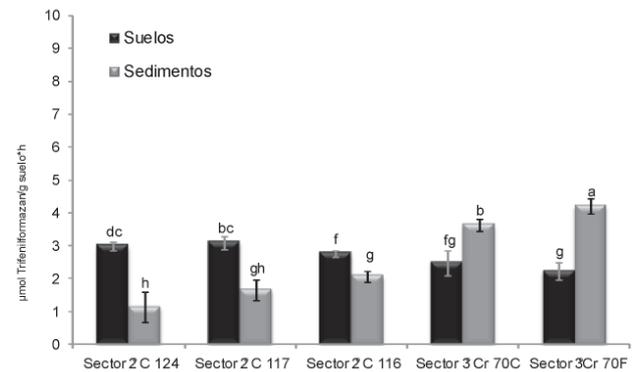
**Tabla 1.** pH de muestras de agua y de suelo.

Lugar de muestreo	pH del agua	pH del suelo
Humedal Córdoba/ Segundo sector (Calle 124)	6,48	6,12
Humedal Córdoba/ Segundo sector (Calle 117)	7,42	6,48
Humedal Córdoba/ Segundo sector (Calle 116)	7,12	6,33
Humedal Córdoba/ Tercer sector (Cra. 70C)	7,96	6,74
Humedal Córdoba/ Tercer sector (Cra. 70F)	8,05	7,25
Río Juan Amarillo/Cra. 91	8,55	6,92
Río Juan Amarillo/Cra. 94 L	9,90	7,12

Juan Amarillo (Cr 91-94L) evidencia las problemáticas dadas por una parte a la modificación hidráulica del río por la construcción de jarillones y por otra, a la contaminación que sufre el río por la adición de vertimientos domésticos e industriales, relacionadas con la alta densidad de ocupación y producción urbana y otras fuentes de contaminación como el pastoreo de animales.

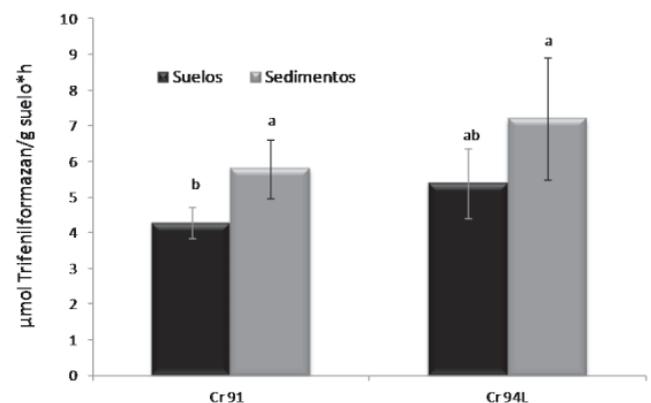
**Actividad deshidrogenasa.** La medida de esta actividad enzimática en los suelos y sedimentos comprende distintos sistemas deshidrogenasas y su origen está en la oxidación biológica, mediante procesos de deshidrogenación de diferentes compuestos orgánicos, que se ligan a una cadena de transporte de electrones acoplados a la síntesis de ATP, la cual tiene bajo condiciones aeróbicas al oxígeno como aceptor final, por lo que se considera (Casida *et al.* 1964) una medida *in situ* de actividad microbiana. La variación de la actividad deshidrogenasa refleja el estatus de degradación/rehabilitación de los terrenos, se ha encontrado (Doi & Ranamukhaarachchi, 2009; García *et al.* 1997) correlación significativa con la disminución de la densidad y el aumento de la capacidad de campo, siendo un criterio para medir dicho estatus en los suelos. La actividad deshidrogenasa se considera además una técnica superior (Soares *et al.* 2006) a las que involucran un umbral de observación, como por ejemplo los recuentos de un grupo microbiano objetivo por número más probable, también responde a gradientes ambientales, sirviendo como una medida integrativa de la calidad. Dado lo anterior, es ampliamente aplicada (Maliszewska-Kordybuch & Smreczek, 2003) en pruebas ecotoxicológicas en suelos.

Se encontró que la actividad deshidrogenasa (Gráfica 1) fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en los sedimentos tomados en el tercer sector del Humedal Córdoba (Cra. 70C-70F) en relación con la misma, evaluada en los sedimentos tomados en el segundo sector (Calle 124-116). En general no hubo diferencias significativas entre las activi-



**Gráfica 1.** Actividad deshidrogenasa ( $\mu\text{g}$  de TPF/g suelo seco\*h) en sedimentos y suelos aledaños al Humedal de Córdoba. Las columnas corresponden al promedio de tres replicas y las barras a su desviación estándar, letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

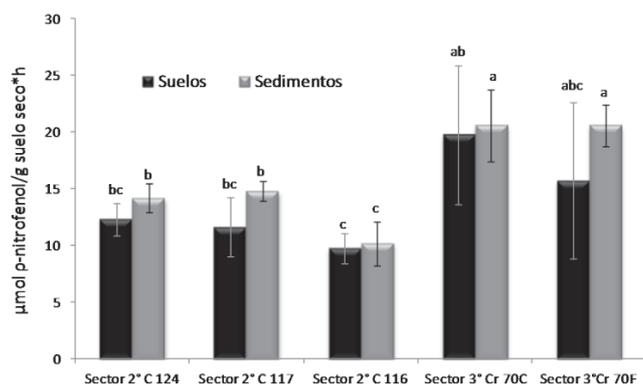
dades evaluadas en los suelos aledaños al Humedal. En el segundo sector los suelos presentaron una actividad significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en relación a la evaluada en los sedimentos tomados en el mismo lugar, mientras que en el tercer sector se observó lo contrario. No se encontraron diferencias significativas entre las actividades de suelos y sedimentos colectados del río Juan Amarillo (Gráfica 2), pero en promedio fue alrededor del doble frente a la misma determinación para el Humedal Córdoba, lo que se puede relacionar directamente con las problemáticas de manejo y contaminación que presenta el río Juan Amarillo. La actividad deshidrogenasa puede responder (Jeziarska-Tys & Frać, 2009) a incrementos en la concentración de amonio  $\text{NH}_4^+$  y del pH, debidos a la aplicación diaria de diferentes dosis de lodos residuales ricos en carbono y nitrógeno. Se ha encontrado (Weaver *et al.* 2011)



**Gráfica 2.** Actividad deshidrogenasa ( $\mu\text{g}$  de TPF/g suelo seco\*h) en sedimentos y suelos aledaños al río Juan Amarillo. Las columnas corresponden al promedio de tres replicas y las barras a su desviación estándar, letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

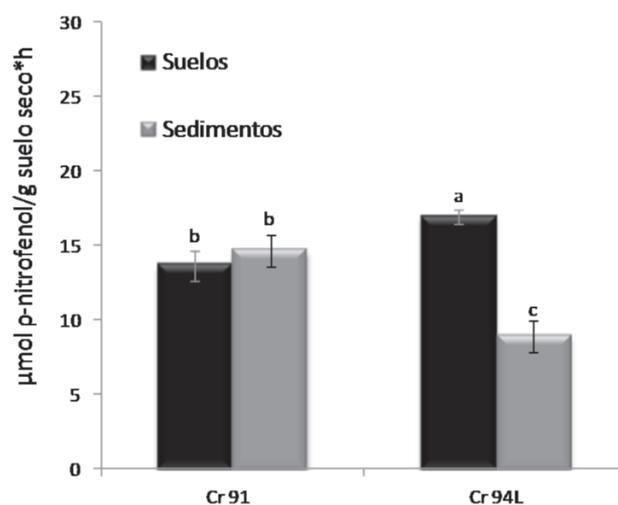
más del doble de la actividad en humedales construidos frente a humedales naturales no disturbados, acompañada de una disminución en la diversidad microbiana y un descenso en las poblaciones de hongos e incrementos en bacterias gran-positivas; también es un indicador sensible para medir toxicidad por metales pesados y contaminantes orgánicos (Gianfreda *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2005; Wu *et al.* 2008; Peruzzi *et al.* 2011) junto con la actividad fosfatasa, así como otros parámetros como bacterias totales y respiración. La incorporación de lodos de aguas residuales urbanas tiene efecto sobre la actividad microbiana por el incremento de nutrimentos, ellos contienen niveles apreciables de nitrógeno (amonio, nitritos nitratos), fósforo y micronutrientes como Fe, Cu y Zn, que pueden ser eliminados al ser irrigados controladamente (Brzezińska *et al.* 2001) ya que, el suelo puede actuar como una especie de filtro natural (Chen *et al.* 2008); sin embargo, altas dosis de dichos residuos también inhiben la actividad microbiana (Singh & Agrawal, 2008) por la presencia de metales pesados y sustancias tóxicas, que deben ser considerados prioridad para su biorremediación, la presencia de dichas sustancias en el ambiente lleva a las poblaciones que lo habitan a estrés, evidenciado también (Vieira *et al.* 2003) por el incremento de la tazas metabólicas de (qCO<sub>2</sub>). En planicies inundables del ríos se ha observado (Carreira *et al.* 2008) inhibición de las actividades deshidrogenasa y fosfatasa ácida, en respuesta a la contaminación con metales pesados y su recuperación después de restauración de la vegetación.

**Actividad fosfatasa alcalina.** Se encontró que la actividad fosfatasa alcalina fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en los sedimentos tomados en el tercer sector del Humedal Córdoba (Gráfica 3), en relación con la misma



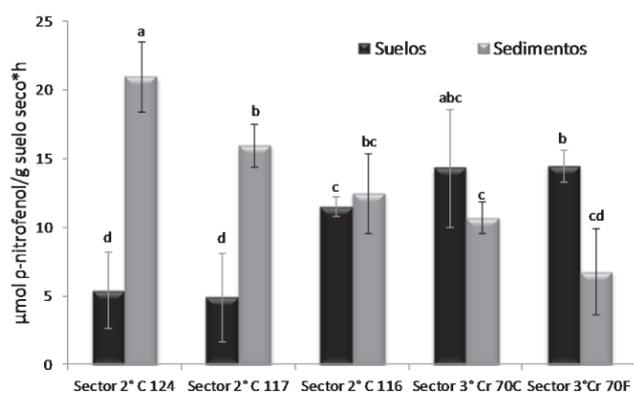
**Gráfica 3.** Actividad fosfatasa alcalina ( $\mu\text{mol p-nitrofenol/g suelo seco}^*\text{h}$ ) en sedimentos y suelos aledaños al Humedal de Córdoba. Las columnas corresponden al promedio de tres réplicas y las barras a su desviación estándar, letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

evaluada en los sedimentos y suelos tomados en el segundo sector. En general no hubo diferencias significativas la actividad evaluada en los suelos aledaños al Humedal, solamente para las muestras de suelos tomadas en el el tercer sector (Cra. 70C) donde la actividad fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ), frente a la evaluada en los suelos del segundo sector (C 116). En el río Juan Amarillo (Gráfica 4), la actividad de los sedimentos tomados a la altura de la carrera 94L fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ), frente a las demás fosfatasas alcalinas evaluadas en este lugar. Aunque el pH es uno de los factores determinantes (Güsewell & Freeman, 2005; Acosta-Martínez & Tabatabai, 2000; Canet *et al.* 2000; Kang & Freeman, 1999) en la actividad microbiana, únicamente se observó que puede tener relación con el incremento de la actividad evaluada en los sedimentos en el tercer sector del humedal. Las modificaciones que la urbanización han dado a los ecosistemas del sistema Córdoba-Juan Amarillo como la fragmentación y la disminución de vegetación en el tercer sector en el humedal; la construcción del jarillón en el río Juan Amarillo y la contaminación, se pueden relacionar con el incremento en las actividades fosfatasa y deshidrogenasa. La construcción de diques y jarillones trae consigo modificaciones hidrológicas, cambios en la composición vegetal, en la disponibilidad de agua, en la química de los suelos inundables y por tanto, cambios en la dinámica de la materia orgánica; factores que se han relacionado anteriormente (Kang & Stanley, 2005) con incrementos significativos en las actividades deshidrogenasa, fosfatasa y glucosidasa.

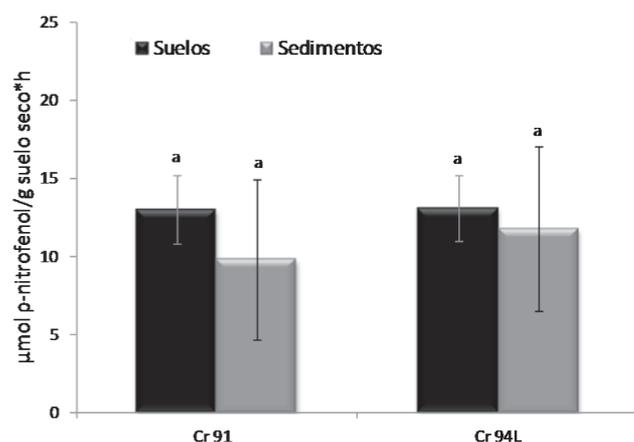


**Gráfica 4.** Actividad fosfatasa alcalina ( $\mu\text{mol p-nitrofenol/g suelo seco}^*\text{h}$ ) en sedimentos y suelos aledaños al río Juan Amarillo. Las columnas corresponden al promedio de tres réplicas y las barras a su desviación estándar, letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

**Actividad Fosfatasa ácida.** La actividad en los sedimentos tomados en el segundo sector del Humedal Córdoba (Gráfica 5) a la altura de las calle 124-117, fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) frente a la actividad evaluada en los sedimentos tomados en tercer sector del humedal. Por el contrario, la actividad de los suelos del segundo sector del humedal (C 124 y 117), presentaron una actividad significativamente menor ( $p < 0,05$ ), frente a la de los demás suelos tomados en el humedal. No hubo diferencias significativas entre las fosfatasas ácidas de los sedimentos y suelos del río Juan Amarillo (Gráfica 6) y dicha actividad fue similar a la encontrada en el tercer sector del humedal.



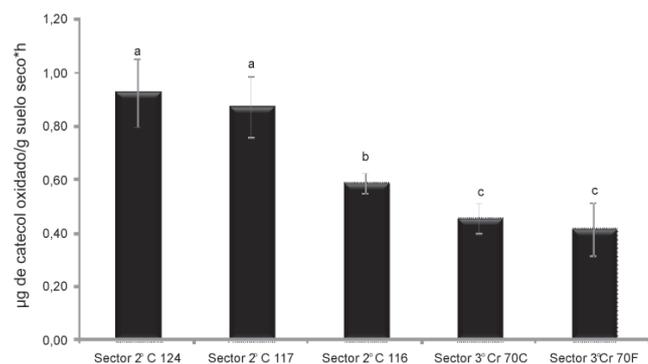
**Gráfica 5.** Actividad fosfatasa ácida ( $\mu\text{mol p-nitrofenol/g suelo seco}^*\text{h}$ ) en sedimentos y suelos aledaños al Humedal de Córdoba. Las columnas corresponden al promedio de tres réplicas y las barras a su desviación estándar, letras iguales indican que no hay diferencias significativas.



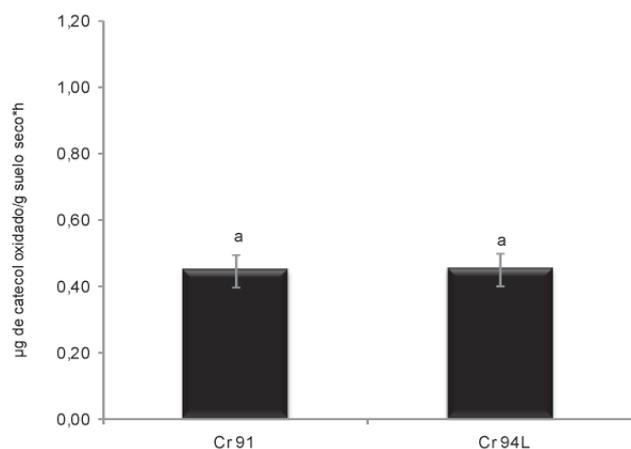
**Gráfica 6.** Actividad fosfatasa ácida ( $\mu\text{mol p-nitrofenol/g suelo seco}^*\text{h}$ ) en sedimentos y suelos aledaños al río Juan Amarillo. Las columnas corresponden al promedio de tres réplicas y las barras a su desviación estándar, letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

La actividad fosfatasa en suelos esta dada principalmente por las enzimas microbianas (fosfatasa alcalina) y la enzimas excretadas por la raíces de las plantas (fosfatasa ácida), dicha actividad puede ser estimulada por el sustrato (Gressel & McColl, 2003) compuestos orgánicos de fósforo, aunque no se ha observado (Güsewell & Freeman, 2005) una relación directa con la limitación de fósforo. El comportamiento de la actividad fosfatasa ácida evaluada en el sistema Córdoba-Juan Amarillo se puede atribuir a que, por una parte, en segundo sector se encuentra diversidad de vegetación acuática, que disminuye considerablemente el tercer sector, debido a la fragmentación del humedal y por otra en el río Juan amarillo encontramos la mayor afectación del sistema, por las problemáticas mencionadas anteriormente. Se ha reportado en humedales construidos y su interacción con los contaminantes (Gagnon *et al.* 2007; Yang *et al.* 2008) que el tipo de vegetación puede incrementar la actividades fosfatasas, al evaluar la posible producción de estas enzimas por especies macrófitas, se encontró una mayor densidad y actividad microbiana en presencia de dichas plantas, siendo posible relacionar la actividad microbiana, el crecimiento vegetal y las tasas de remoción de materia orgánica; dado que, en las superficies radicales están presentes gran diversidad de bacterias aerobias y facultativas envueltas en biopelículas. Se recomienda (Peruzzi *et al.* 2011) introducir diferentes especies de macrófitas acuáticas, para incrementar la actividad microbiana y estudiar el efecto de la especie vegetal sobre la misma, por ejemplo para incrementar la eficiencia en humedales construidos para el tratamiento de lodos de aguas residuales y contaminación por metales pesados.

**Actividad o-difenol oxidasa.** La actividad determinada en las muestras de suelo colectadas en el segundo sector del humedal (Gráfica 7) a la altura de las calles 124 y 117, fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) a las demás o-difenol oxidasas evaluadas en el humedal. En el río Juan amarillo (Gráfica 8) la actividad fue similar a la encontrada en los suelos del tercer sector del humedal. Como ya se mencionó, en los suelos del segundo sector del humedal (C 124 y 117) se encuentran un matillo de agujas de pino, este material vegetal resulta recalcitrante, debido su contenido de compuestos fenólicos. La o-difenol oxidasa cataliza la oxidación de compuestos fenólicos a catecol (Perucci *et al.* 2000), proporcionando una medida de la capacidad de la microbiota para degradar materiales potencialmente recalcitrantes. Los polifenoles, el catecol y el metil catecol son compuestos tóxicos inclusive para los microorganismos (Ramos-Cormenzana *et al.* 1996; Capasso *et al.* 1995) y poseen en general efecto inhibitorio sobre otras enzimas (Freeman *et al.* 2004), dicho efecto



**Gráfica 7.** Actividad o-difenol oxidasa ( $\mu\text{mol}$  catecol oxidado/g suelo seco\*h) en suelos aldeaños al Humedal de Córdoba. Las columnas corresponden al promedio de tres réplicas y las barras a su desviación estándar, letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

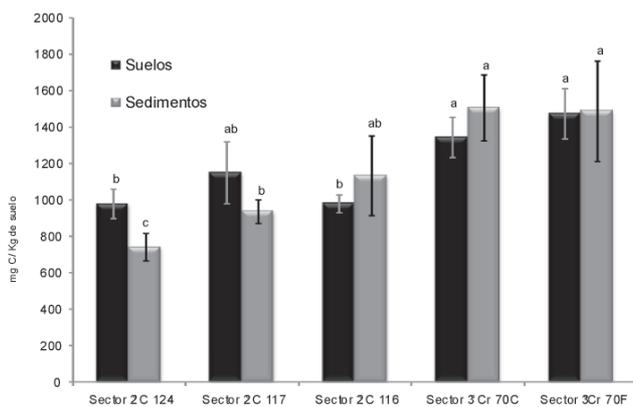


**Gráfica 8.** Actividad o-difenol oxidasa ( $\mu\text{mol}$  catecol oxidado/g suelo seco\*h) en suelos aldeaños al río Juan Amarillo. Las columnas corresponden al promedio de tres réplicas y las barras a su desviación estándar, letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

que se pudo observar en este estudio sobre la actividad fosfatasa, pero no se observó sobre la deshidrogenasa. Se ha observado (Benítez *et al.* 2004) incrementos en la actividad deshidrogenasa y en la o-difenol oxidasa, en respuesta a la adición de residuos compostados de la industria de la oliva ricos en polifenoles, la disponibilidad de oxígeno también incrementa la actividad (Kang *et al.* 2009) dado que este participa en la reacción, así como el pH (6-7) y el contenido de fenoles disueltos (Toberman *et al.* 2010) son cruciales en su regulación; ya que la actividad deshidrogenasa está relacionada con el estado metabólico de las poblaciones microbianas (García *et al.* 1997; Casida *et al.* 1964) la relación entre actividades deshidrogenasa y o-difenol oxidasa, proporciona información acerca de respuesta de las comunidades microbianas a la presencia de

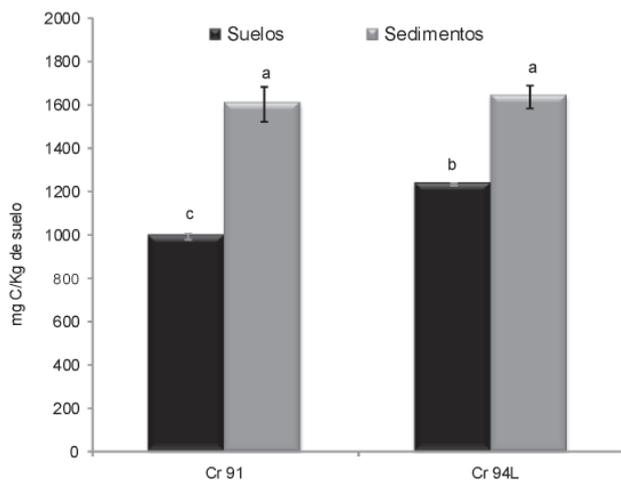
estos compuestos fenólicos, lo que indica que hay un proceso de degradación y por tanto una dinámica de la materia orgánica en el mantillo, localizado en el segundo sector del humedal Córdoba. La actividad o-difenol oxidasa está relacionada con la tasa degradación vegetal en el mantillo, por lo que está influenciada directamente por el tipo de vegetación y su expresión está ligada a la disponibilidad de nutrientes; se ha observado (Monkiedje *et al.* 2006) que el incremento de nutrientes (nitrógeno y fósforo) por efecto de diferentes prácticas agrícolas, tienen efectos negativos sobre la actividad, así como, el incremento de nutrientes y la disminución de la diversidad vegetal en ecosistemas acuáticos naturales, tienen influencia negativa (Penton & Newman, 2008) sobre esta actividad. Se puede postular, que la disminución de la actividad o-difenol oxidasa en tercer sector del humedal y en el río Juan Amarillo, puede estar relacionada con la disminución de la diversidad vegetal y la introducción de residuos urbanos al sistema; las tres enzimas determinadas en este estudio pueden responder a la fragmentación del Humedal Córdoba, que trae como consecuencia la reducción del espejo de agua, la reducción en la diversidad de la vegetación y el aumento del pH de aguas y suelos, entre el segundo y tercer sector. La actividad deshidrogenasa fue el indicador que mejor respondió a la afectación de los diferentes puntos de muestreo que se tomaron el sistema Córdoba Juan Amarillo, actividad que anteriormente se pudo establecer (Cerón & Ramírez, 2011) como indicador relacionado con el gradiente de contaminación presente en la cuenca alta de río Arzobispo en Bogotá D.C.; la actividad deshidrogenasa encontrada en el río Juan Amarillo puede tener relación con aumento de las descargas de residuos urbanos, disminución en la diversidad de la vegetación y actividades como el pastoreo de animales.

**Fracción de Carbono activo.** Esta determinación se trata de una fracción pequeña y relativamente variable de carbono orgánico lábil, es el combustible de la cadena alimenticia, posee una gran influencia en los ciclos de los nutrientes y en muchas de las propiedades biológicas de los suelos, por lo que se denomina una fracción activa a diferencia del carbono orgánico total, el cual es fuente de un carbono pasivo o altamente recalcitrante. La fracción activa de carbono sirve como indicador de calidad dado que, es sensible a los cambios inducidos por el manejo. El carbono activo incluye el carbono microbiano, la materia orgánica particulada y los carbohidratos presente en el suelo. Se encontró una cantidad de carbono activo significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en los sedimentos y suelos del tercer sector del humedal (Gráfica 9), frente de los suelos y sedimentos en el segundo del segundo sector solo para el punto C 124; no hubo diferencias significativas



**Gráfica 9.** Fracción de carbono activo (mg C/Kg suelo seco) en sedimentos y suelos aledaños al Humedal de Córdoba. Las columnas corresponden al promedio de tres réplicas y las barras a su desviación estándar, letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

entre el carbono activo evaluado en tercer sector del humedal, el de los suelos colectados a la altura de la calle 117 (segundo sector) y el de los sedimentos colectados a la altura de la calle 116 (segundo sector), aunque fueron menores en promedio. En general no hay diferencias en el carbono activo evaluado entre suelos y sedimentos tomados en un mismo punto del humedal, por el contrario en el río Juan Amarillo (Gráfica 10) se encontraron contenidos de carbono activo significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) en los sedimentos frente a los encontrados en los suelos. Los contenidos de carbono activo en los suelos y sedimentos del río Juan Amarillo son similares a los encontra-



**Gráfica 10.** Fracción de carbono activo (mg C/Kg suelo seco) en sedimentos y suelos aledaños al río Juan Amarillo. Las columnas corresponden al promedio de tres réplicas y las barras a su desviación estándar, letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

dos en el tercer sector del humedal. Posiblemente existe relación entre la actividad deshidrogenasa y los contenidos de carbono activo evaluados en los sedimentos del humedal Córdoba; pero dicha relación no se pudo observar para el río Juan Amarillo y para los suelos del Humedal, así como no hubo relación entre la actividades fosfatasa y los contenidos de carbono, a través del tramo donde se realizó el estudio, anteriormente se ha visto (Shackle *et al.* 2000) que dichas enzimas no se incrementan por la adición de carbono presentes en suelos de humedales construidos. La introducción de materiales orgánicos derivados de residuos urbanos trae consigo aumento en los contenidos de carbono y así como aumento en las actividades fosfatasa y deshidrogenasa (Peruzzi *et al.* 2011; Jezierska-Tys & Frąc, 2009; Singh & Agrawal, 2008; Monkiedje *et al.* 2006; Caravaca *et al.* 2005; Gianfreda *et al.* 2005) actividades que también en humedales responden (Hill *et al.* 2006) a gradientes por contaminación de residuos urbanos.

Los humedales proporcionan muchas funciones críticas en los ecosistemas urbanos, que incluyen hábitat de fauna y mejoramiento de la calidad del agua. Existe interés en restaurar o construir humedales para incrementar dichas funciones, dada la extendida pérdida a escala global de estos y los problemas de calidad de agua debido a la urbanización. Las características físicas, químicas y biológicas de los humedales cambian constantemente en función de los disturbios, por lo que se genera gran interés en definir el umbral al cual un efecto significativo que ponga en peligro la integridad biológica o de la calidad del agua. Recientemente y desde casi una década, se han reportado estudios (Cerón & Ramírez, 2011; Weaver *et al.* 2011; Gagnon *et al.* 2007; Yang *et al.* 2008; Penton & Newman, 2008; Hill *et al.* 2006; Kang & Stanley, 2005; Gianfreda *et al.* 2005; Shackle *et al.* 2000) sobre de la utilidad de las enzimas para obtener información acerca del impacto de la modificación y contaminación, sobre las funciones de ecosistemas acuáticos y de el efecto de la restauración de los mismos por la introducción de especies vegetales (Peruzzi *et al.* 2011; Carreira *et al.* 2008), se ha postulado (Beare *et al.* 1995) que al incrementarse la diversidad comunidad vegetal se puede contribuir al enriquecimiento de la fertilidad del suelo y de su estructura ecológica. Por otra parte, no existe un consenso claro acerca de los indicadores apropiados de las condición ecológica ni un “gold standard” (Brown *et al.* 2010) a la hora de medir la contaminación de los sedimentos y su efecto biológico, dado que es necesario establecer que factores tienen influencia directa en la actividad microbiana, esencial para los procesos de biodegradación, adsorción y para evitar la acumulación de materia orgánica e inorgánica.

## Conclusiones

Dada la intervención del crecimiento urbano, el sistema Córdoba- Juan Amarillo ha sufrido varias modificaciones que comprometen principalmente la calidad del agua y su conservación. El comportamiento de las actividades deshidrogenasa, fosfatasa alcalina y ácida y o-difenol oxidasa evaluadas en este estudio entre el segundo y tercer sector del humedal Córdoba, pueden responder a dicha fragmentación, que trae como consecuencia la reducción del espejo de agua, la reducción en la diversidad de la vegetación y el aumento del pH de aguas y suelos; la presencia de un mantillo de agujas de pino en los suelos del segundo sector del humedal estimuló la actividad o-difenol oxidasa y puede tener un efecto negativo sobre las fosfatasas, pero no sobre la actividad deshidrogenasa, lo que indica un proceso de degradación activo y por tanto una dinámica de la materia orgánica, en el mantillo localizado en el segundo sector del humedal Córdoba. La disminución de la actividad o-difenol oxidasa en tercer sector del humedal y en el río Juan Amarillo, puede estar relacionada con la disminución de la diversidad vegetal y la introducción de residuos urbanos al sistema. A medida que el sistema está más intervenido se encontró incremento del pH tanto en suelos y aguas, el pH determinado en las aguas y suelos del río Juan Amarillo evidencia las problemáticas del sector, por un lado, la modificación hidráulica del río por la construcción de jarillones y por otra, a la contaminación que sufre el río por la adición de vertimientos domésticos e industriales. La actividad deshidrogenasa fue el indicador que mejor respondió a la afectación de los diferentes puntos de muestreo que se tomaron en el sistema Córdoba Juan Amarillo, la alta actividad deshidrogenasa encontrada en el río Juan Amarillo puede tener relación con aumento de las descargas de residuos urbanos, disminución en la diversidad de la vegetación y actividades como el pastoreo de animales. Con este estudio fue posible postular como la actividad microbiana presente en suelos y sedimentos, puede responder a la intervención y contaminación que sufre el sistema Córdoba-Juan Amarillo, por lo que se recomienda el uso de dichas actividades como parámetro de evaluación de programas de manejo ambiental para el sistema.

## Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad EAN por la financiación del presente estudio.

## Referencias bibliográficas

- Acosta-Martínez, V. & Tabatabai, M.A. 2000. Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils* 31:85-91.
- Benítez, E., Melgar, R. & Nogales, R. 2004. Estimating soil resilience to a toxic organic waste by measuring enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1615-1623.
- Blair, G.J., Lefroy, R.D.B. & Lisle, L. 1995. Soil carbon fraction based in their degree of oxidation and the development of a carbon management index for agricultural systems. *Australian Journal of Agricultural Research* 46:1459-1466.
- Brown, J.S., Sutula, M., Stransky, C., Rudolph, J. & Byron, E. 2010. Sediment Contaminant Chemistry and Toxicity of Freshwater Urban Wetlands in Southern California. *Journal of the American Water Resources Association* 46:367-385.
- Brzezińska, M., Stêpniewska, Z. & Stêpniewski, W. 2001. Dehydrogenase and Catalase Activity of Soil Irrigated with Municipal Wastewater. *Polish Journal of Environmental Studies*. 10:307-311.
- Beare, M.H., Coleman, D.C., Crossley, D.A., Hendrix, P.F. & Odum, E.P. 1995. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant and Soil* 170:5-22.
- Burns, R.G. 1982. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14: 423-427.
- Caldwell, B.A. 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia* 49:637-644.
- Canet, R., Albiach, R. & Pomares, F. 2000. Indexes of Biological Activity as Tools for Diagnosing Soil Fertility In Organic Farming. In: Garcia C, Hernández T, editores. *Research and Perspectives of Soil Enzymology in Spain*. Murcia, Spain 7 Cebas-CSIC; p. 27-39.
- Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M.A. & Cristinzio, G. 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology* 79:393-398.
- Carreira, J.A., Viñegla, B., García-Ruiz, R., Ochoa, V. & Hinojosa, M.B. 2008. Recovery of biochemical functionality in polluted flood-plain soils: The role of microhabitat differentiation through revegetation and rehabilitation of the river dynamics. *Soil Biology and Biochemistry* 40:2088-2097.
- Caravaca, F., Alguacil, M.M., Torres, P. & Roldán, A. 2005. Plant type mediates rhizospheric microbial activities and soil aggregation in a semiarid Mediterranean salt marsh. *Geoderma* 124:375-382.
- Casida, L.E.Jr., Klein, D.A. & Santoro, T. 1964. Soil Dehydrogenase Activity. *Soil Science* 98:371-376.
- Castaña, M. 2002. Verdades sobre el Humedal de Córdoba. Entre Juncos Boletín de la Red de Humedales de la Sabana de Bogotá. No. 5. p.p 3
- Cerón Rincón, L.E. & Melgarejo, L.M. 2005. Enzimas de suelo: indicadores de salud y calidad. *Acta Biológica Colombiana*. 10:5-17.

- \_\_\_\_\_, L.E., & Ramírez, E. 2011. Actividad microbiana en el río Arzobispo. Agronomía Colombiana. (En prensa).
- Chen, W., Wu, L., Frankenberger, W.T.Jr. & Chang, A.C.** 2008. Soil Enzyme Activities of Long-Term Reclaimed Wastewater-Irrigated Soils. *Journal of Environmental Quality* 37:S-36-S-42.
- DAMA** Departamento Administrativo del Medio Ambiente. 2006. Política de Humedales. ©Alcaldía Mayor de Bogotá.
- \_\_\_\_\_. 2008. Plan de Manejo del Humedal Córdoba. ©Alcaldía Mayor de Bogotá.
- \_\_\_\_\_. 2010. Plan de Manejo del Humedal Juan Amarillo. ©Alcaldía Mayor de Bogotá.
- Dick A. & Tabatabai, M.A.** 1992. Significance and Potential Use of Soil Enzymes. En: Meeting, FJB (Ed.). *Soil Microbial Ecology: Applications in Agriculture and Environmental Management*. Marcel Dekker, NY, USA. pp. 95-127.
- Doi, R. & Ranamukhaarachchi, S.L.** 2009. Soil dehydrogenase in a land degradation-rehabilitation gradient: observations from a savanna site with a wet/dry seasonal cycle. *Revista de Biología Tropical* 57:223-234.
- Doran J.W.** 2002. Soil Health and Global Sustainability Translating Science into Practice. *Agriculture Ecosystems Environment*. 88:119-127.
- \_\_\_\_\_. & **Zeiss, M.R.** 2000. Soil Health and Sustainability: Managing the Biotic Component of Soil Quality. *Applied Soil Ecology* 15:3-11.
- Eivazi, F. & Tabatabai, M.A.** 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 9:167-172.
- Freeman, C., Ostle, N.J., Fenner, N. & Kang, H.** 2004. A regulatory role for phenol oxidase during decomposition in peatlands. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1663-1667.
- Gagnon, V., Chazarenc, F., Comeau, Y. & Brisson, J.** 2007. Influence of macrophyte species on microbial density and activity in constructed wetlands. *Water Science and Technology* 56:249-254.
- García, C., Hernández, T., Costa, F.** 1997. Potencial use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analyses* 28:123-134.
- Gianfreda, L., Rao, M.A., Piotrowska, A., Palumbob, G. & Colombob, C.** 2005. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of the Total Environment* 341:265-279.
- Gressel, N. & McColl, J.G.** 2003. Phosphorus mineralization and organic matter decomposition: a critical review. Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition (eds G.Cadisch & K.E.Giller), CAB International, Wallingford, UK. pp. 297-309.
- Güsewell, S. & Freeman, C.** 2005. Nutrient limitation and enzyme activities during litter decomposition of nine wetland species in relation to litter N:P ratios. *Functional Ecology* 19:582-593.
- Hernández, M.E.** 2010. Suelos de Humedales Como Sumideros De Carbono y Fuentes de Metano. *Terra Latinoamericana* 28:139-147.
- Hill, B.H., Elonen, C.M., Jicha, T.M., Cotter, A.M., Trebitz, A.S. & Danz, N.P.** 2006. Sediment microbial enzyme activity as an indicator of nutrient limitation in Great Lakes coastal wetlands. *Freshwater Biology* 51:1670-1683.
- Jeziarska-Tys, S. & Frąc, M.** 2009. Impact of dairy sewage sludge on enzymatic activity and inorganic nitrogen concentrations in the soils. *International Agrophysics* 23:31-37.
- Kang, H., Lee, S.H., Lee, S.M. & Jung, S.** 2009. Positive relationships between phenol oxidase activity and extractable phenolics in estuarine soils. *Chemistry and Ecology* 25:99-106.
- \_\_\_\_\_. & **Stanley, E.H.** 2005. Effects of levees on soil microbial activity in a large river floodplain. *River Research and Applications* 21:19-25.
- Kang, H. & Freeman, C.** 1999. Phosphatase and arylsulphatase activities in wetland soils: annual variation and controlling factors. *Soil Biology and Biochemistry* 31:449-454.
- Kibblewhite, M.G., Ritz, K. & Swift, J.** 2008. Soil health in agricultural systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363:685-701.
- Maliszewska-Kordybuch, B. & Smreczek, B.** 2003. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environment International* 28:719-728.
- Monkiedje, A., Spiteller, M., Fotio, D. & Sukul, P.** 2006. The effect of land use on soil health indicators in peri-urban agriculture in the humid forest zone of southern Cameroon. *Journal of Environmental Quality* 35:2402-2409.
- Palacio, D., Hurtado, R. & Garavito, L.** 2003. Redes Socio-ambientales en tensión: El caso de la gestión ambiental de los humedales de Bogotá. REDES- Revista hispana para el análisis de redes sociales 4:1-31.
- Penton, C.R., & Newman, S.** 2008. Enzyme-based resource allocated decomposition and landscape heterogeneity in the Florida everglades. *Journal of Environmental Quality* 37:972-976.
- Peruzzi, E. Masciandaro, G., Macci, C., Doni, S., Mora Ravelo, S.G., Peruzzi, P. & Ceccanti, B.** 2011. Heavy metal fractionation and organic matter stabilization in sewage sludge treatment wetlands. *Ecological Engineering* 37:771-778.
- Perucci, P., Casucci, C. & Dumontet, S.** 2000. An improved method to evaluate the o-diphenol oxidase activity of soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32:387-399.
- Ramos-Cormenzana, A., Juárez-Jiménez, B. & Garcia-Pareja, M.P.** 1996. Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38:283-290.
- Shackle, V.J., Freeman, C. & Reynolds, B.** 2000. Carbon supply and the regulation of enzyme activity in constructed wetlands. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1935-1940.

- Singh, R.P. & Agrawal, M.** 2008. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management* 28:347-358.
- Soares, R.A., Roesch, L.F.W., Zanatta, G., Camargo F.A. & Passaglia, L.M.P.** 2006. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. *Applied Soil Ecology* 33:221-234.
- Toberman, H., Laiho, R., Evans, C.D., Artz, R.R.E., Fenner, N., Strakov, P. & Freeman, C.** 2010. Long-term drainage for forestry inhibits extracellular phenol oxidase activity in Finnish boreal mire peat. *European Journal of Soil Science* 61:950-957.
- Vieira, R.F., & Silva, C.M.** 2003. Soil amendment with sewage sludge and its impact on soil microflora. *Brazilian Journal of Microbiology* 34(Suppl.1):56-58.
- Weaver, M.A., Zablotowicz, R., Larry, K., Martin, L. & Charles, B.** 2011. Microbial and vegetative changes associated with development of a constructed wetland. *Ecological Indicator*. En prensa.
- Weil, R.R., Islam, K.R., Stine, M.A., Gruver, J.B. & Samson-Liebig, S.E.** 2003. Estimating active carbon for soil quality assessment: A simplified method for laboratory and field use. *American Journal of Alternative Agriculture* 18:3-17.
- Wu, Y., Tam, N.F.Y. & Wong, M.H.** 2008. Effects of salinity on treatment of municipal wastewater by constructed mangrove wetland microcosms. *Marine Pollution Bulletin* 57:727-734.
- Yang, Q., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Luan, T.G., Su, W.S., Lan, C.Y., Shin, P.K.S. & Cheung, S.G.** 2008. Potential use of mangroves as constructed wetland for municipal sewage treatment in Futian, Shenzhen, China. *Marine Pollution Bulletin* 57:735-743.
- Zhou, Q.H., Wu, Z.B., Cheng, S.P., He, F. & Fu, G.P.** 2005. Enzymatic activities in constructed wetlands and di-n-butyl phthalate (DBP) biodegradation. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1454-1459.

Recibido: agosto 5 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.



# CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA MATERIA ORGÁNICA NATURAL DEL RÍO PASTO

Milton Rosero Moreano<sup>1,2</sup>, Cristina Nerín de la Puerta<sup>2</sup>, Gonzalo Taborda Ocampo<sup>1</sup>, Gloria Rodríguez Martínez<sup>3</sup>

## Resumen

**Rosero Moreano, M., C. Nerín de la Puerta, G. Taborda Ocampo, G. Rodríguez Martínez:** Caracterización química de la materia orgánica natural del río Pasto. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **35** (136): 363-369, 2011. ISSN 0370-3908.

Este trabajo muestra los aspectos más relevantes relacionados con la primera caracterización química de la materia orgánica natural del río Pasto. Para este propósito fue necesario el uso de técnicas de análisis instrumental moderno tales como la: Termoquimólisis-CG-MS, Cromatografía de fraccionamiento en flujo mediante campos; plasma acoplado inductivamente acoplado a espectrometría de masas ICP-MS. Los resultados muestran que los principales componentes de esta materia fueron compuestos orgánicos tales como ácidos carboxílicos, compuestos aromáticos con pesos moleculares alrededor de 5 kDa. La presencia de hierro y cromo son signos de una posible contribución de suelos volcánicos del área ricos en pirita y algunos efluentes descargados sin control de la pequeña industria artesanal del cuero respectivamente.

**Palabras claves:** MON, termoquimólisis-CG-MS, fraccionamiento en flujo mediante campos, río Pasto.

## Abstract

This work shows the more relevant issue related with the first chemical characterization of natural organic matter of Pasto River. Modern instrumental analysis techniques such as Thermochemolysis-GC-MS; Field flow fractionation chromatography and Inductively coupled plasma mass spectrometry ICP-MS were necessary. The results showed that the main composition of this matter were organic compounds such as carboxylic acids, aromatic compounds with molecular mass around 5 kDa. The presence of iron and chromium ions are signs of a possible contribution of pyrite-rich volcanic soils of the area and some effluent discharged without control of the small artisanal leather industry respectively.

**Key words:** NOM, thermochemolysis-GC-MS; field flow fractionation; Pasto's river.

<sup>1</sup> Departamento de Química, Universidad de Caldas, Calle 65 No. 26-10, A.A. 265 Manizales, Colombia.

<sup>2</sup> Departamento de Química Analítica, Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón I3A, EINA, Campus río Ebro. Universidad de Zaragoza, Edificio Torres Quevedo, Calle María de Luna 3,50018 Zaragoza, España.

<sup>3</sup> Empresa de Obras Públicas y Sanitarias de Pasto EMPOPASTO Pasto, Colombia.

## Introducción

En la actualidad los tratamientos en las plantas potabilizadoras dirigen su objetivo esencial de eliminación en la materia orgánica natural MON, dada la alta formación de subproductos de desinfección, el detrimento de la calidad visual por la presencia de olores y sabores desagradables, la formación de biopelículas de la fracción remanente a lo largo de las tuberías de conducción del agua con el riesgo microbiológico que ello representa y la aducción de metales por el alto grado de acomplejamiento que presenta (Pavel, J. 2003; Laborda, F. 2008; Laborda, F. 2009; Matilainen, A. 2010). Los procesos avanzados de oxidación PAOs para la remoción de MON han venido tomando gran repercusión (Matilainen, A. 2010); pero definitivamente a pesar del gran avance en su eliminación, la identificación exhaustiva de la composición de la materia orgánica natural requiere de instrumental analítico muy robusto (Wu, F.C. 2007). La separación cromatográfica sin duda alguna es la técnica que mas se ha utilizado para el estudio de este tipo de moléculas cuyos pesos moleculares elevados (> 9000 Da), alta carga neta por la diversidad de sus grupos funcionales, alta labilidad que le confiere su capacidad de asociaciones intermoleculares condicionada por el pH hacen exigente su estudio de composición (Christy, A.A. 1999; Specht, C.H. 2000; Pavel, J. 2003; Wu, F.C. 2007).

El método de termoquimiólisis con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) ha sido recientemente introducido para la caracterización cualitativa de la materia orgánica de las aguas naturales (MON) (Challinor, J.M. 1995; Del Río, J.C. 1998; Christy, A.A. 1999; Mannino, A. 2000; Lehtonen, T. 2000; Frazier, S.W. 2003; Joll, C.A. 2004). Esta caracterización aunque resultó de carácter cualitativo, se utilizó un patrón interno para evaluar las interferencias espectrales y el rendimiento de la reacción de esterificación con TMAH. El fraccionamiento en flujo mediante campos FFF es uno de los métodos menos comunes para la determinación de pesos moleculares, y fue aplicado por primera vez para ácidos húmicos y fúlvicos en los finales de 1980 (Beckett, R. 1987; Pavel, J. 2003; Kowalkowski, T. 2006). Debido a la conocida complejidad y naturaleza de la MON con su alta variabilidad estructural y características de grupos funcionales diversos, la espectroscopia de RMN resulta apropiada y arroja información clave en su elucidación (Chen, J. 2002).

El principal objetivo de este trabajo consiste en dar luces sobre las características químicas de la materia orgánica del río Pasto principal fuente de abastecimiento de la ciudad y que permita el entendimiento de su influencia en la características del agua y el emprendimiento de posibles

acciones para disminuir el riesgo químico asociado con la desinfección en la planta y las reacciones conocidas de formación de subproductos (Chamorro-Bolaños, X. 2009) dado el alto contenido de materia orgánica y color presente en las aguas (Chamorro-Bolaños, X. 2010) y que supone según las revelaciones de este estudio son de origen natural.

## Materiales y métodos

### Muestreo de agua cruda en la planta de potabilización

Las muestras se tomaron en el canal de entrada a la planta Centenario de la ciudad de Pasto, fueron muestras compuestas y se tomaron 8 alícuotas horarias continuas desde las 8:00 a.m. hasta las 3:00 p.m. hasta completar el volumen total de 100 litros en envases de LDPE previamente lavados. Se realizaron dos muestreos: Primer muestreo, 11 de noviembre de 2008 y segundo muestreo del 26 de agosto de 2010 (mezcla río Pasto 450 l/s + río Bobo 120 l/s).

### Liofilización de las muestras de agua del río Pasto

La introducción de muestras se hizo en el módulo FreeZone Stoppering Tray Dryer Freeze Dry System Modelo 79480 y el sitio de producción capa de hielo es un FreeZone 12 Liter Freeze Dry System Modelo 77540 y ambos equipos son marca Labconco. La programación de temperaturas en el liofilizador es la siguiente: permanece a -30°C durante 2 horas y luego pasa a 30°C y se deja la muestra durante 40-48 horas. Por cada muestreo separadamente se tomaron 800mL de agua cruda del río Pasto que se liofilizaron y se obtuvieron 0,04 g de muestra sólida, se recogieron en un vial de plástico y se trasladaron en avión comercial desde el sitio de muestreo. Pasto-Colombia hasta el lugar de análisis en Zaragoza-España, bajo todas las consideraciones de conservación y preservación de muestras.

### Instrumental

#### GC-MS CombiPal HP6890 con automuestreador

Equipo GC-MS CombiPal HP6890 con automuestreador marca Hewlett Packard Horno: Rampa: Temperatura inicial 40°C, se incrementa hasta 310°C a 8,00°C/min. Tiempo de análisis 35,75 minutos Inyección: Modo: Splitless Temperatura inicial 310°C Presión: 7,05 psi Flujo total: 103,6 mL/min Gas de arrastre: He Volumen de inyección: 2,00 microlitros Columna: J&W 122-5532 DB-5ms (30,0 m x 250 µm x 0,25 µm) Modo: flujo constante Flujo inicial: 1,0 mL/min Detector: MSD Modo adquisición: Scan Tiempo de corte solvente: 2,00 min Modo EMV: Relativo Voltaje relativo:

200 Voltaje resultante EM: 1682 Parámetros Scan Masa baja: 35,0 Masa alta: 500,0 Fuente MS: 230°C Cuadrupolo MS: 150°C. Para el análisis de termoquimiólisis con TMAH de la MON, la muestra liofilizada del río Pasto, se homogenizó y 1,0 mg de la muestra se colocó en una ampolla de vidrio con 200  $\mu$ L de TMAH (25% en metanol). El metanol se evapora bajo una corriente de nitrógeno y la ampolla de vidrio fue sellada al vacío y luego se hornea a 250°C durante 30 minutos. Después las ampollas se enfriaron para evitar la pérdida de productos, luego se rompieron las ampollitas y en ese momento se adicionaron 50  $\mu$ L de patrón interno de 38 ppm (eicosano) en una solución en acetato de etilo (1,9  $\mu$ g en total de patrón interno). Los productos fueron extraídos de la ampolla con 1  $\mu$ L de acetato de etilo y se concentró en un vial de CG bajo una corriente de gas nitrógeno a aproximadamente 200  $\mu$ L. Estas muestras se prepararon por duplicado. Finalmente se inyectaron 2.0  $\mu$ L en el equipo de CG-MS.

#### ***Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AsFIFFF)***

Equipo AF2000 Focus Series de Postnova Analytics Principio rango de medición: Partículas: 1nm hasta 100  $\mu$ m Polímeros: 500 Da hasta 10<sup>12</sup> Da Dimensiones del canal: Volumen: entre 0,5-2,5 mL. Tamaño: 335 x 60 x 40 mm Espesor: 250  $\mu$ m Líquidos transportadores: Acuoso: agua MilliQ pH aprox. 7.00 Membrana: Material: Poliacrilato Masa molar: 1 kDa Tamaño de corte: 10 nm Detector: Detector de arreglo de diodos PDA UV-Vis Rango de flujo del canal: 1.0 mL/min Rango de flujo cruzado: 3,0 mL/min Volumen de inyección: 100  $\mu$ L. Para el análisis por fraccionamiento en flujo mediante campos se pesaron 0,0044 g de muestra liofilizada y se diluyó con agua a 20 mL.

#### ***Plasma acoplado inductivamente con detector de masas ICP-MS***

Equipo 7500 Series ICP-MS *Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*, de Agilent Cámara de spray peltier Generador de radiofrecuencia: 27,12 MHz Sistema de antorcha: de escudo Sistema de nebulización: Tipo Babington *Peak pattern: Full Quant* (3 puntos centrales por pico) Tiempo de integración: 0.1 s. Tiempo de integración por masa: 0,3 s. Número de repeticiones: 5 Separador de masas: cuadrupolo. Para el análisis por ICP-MS se pesaron 0,0086 g de muestra liofilizada y se adicionaron 58,0303 g de HNO<sub>3</sub> 1%; para el caso del hiero se requirió una nueva dilución de 1,0082 g de la anterior en 9,7376 g de HNO<sub>3</sub> 1%. La recta de calibración se preparó a partir de la solución estándar multielemento (Fe, Cr, Cd y Pb) de 1000  $\pm$  1 ppm preparando inicialmente una solución de trabajo de 8,9597 ppm y a partir de esta se construyó un rango de concen-

tración desde 9,4546-193,9306 ppb en envases de plástico de polietileno de baja densidad LDPE y pipetas pasteur de plástico y enrasando con HNO<sub>3</sub> 1% todo bajo control gravimétrico. Los isotopos de los cuatro elementos utilizados para la cuantificación en consideración de su abundancia, bajas interferencias espectrales y de matriz y oportunidad fueron: Fe<sub>56</sub>; Cr<sub>53</sub>; Cd<sub>111</sub> y Pb<sub>206</sub>.

## **Resultados y discusión**

### **Lecturas por GC-MS**

Del análisis en modo scan por Termoquimiólisis-GC-MS para las muestras en estudio (ver figura 1) se identificaron en el estándar de ácidos húmicos Sigma-Aldrich 142 compuestos, en la muestra liofilizada río Pasto 1, 51 compuestos y en la muestra 2, 68 compuestos. En las dos muestras evaluadas de MON y en el patrón de ácidos húmicos se apreciaron con gran intensidad picos entre 23 y 28 minutos que corresponden por comparación con la librería espectral de la compañía Wiley (mínimo 90% de probabilidad) a la familia de los FAME (ésteres metílicos de ácidos grasos) en especial los ésteres metílicos de los ácido hexadecanoico (palmitato) y octadecanoico (estearato). Estos compuestos tienen origen microbiano y vegetal a partir de la degradación de lípidos y triglicéridos (Lehtonen, T. 2000) y según (Frazier, S.W. 2003) varían en tamaño a partir del éster metílico del ácido octanoico hasta el éster metílico del ácido tetratricontanoico, donde el éster metílico del ácido hexadecanoico y el éster metílico del ácido octadecanoico a menudo son los picos más prominentes en muestras de MON de río. Para reseñar igualmente que los picos marcados con asterisco en la figura 1 corresponden a compuestos de siloxano metil derivados debido a procesos de desangramiento de la columna y que ratifican que el proceso de derivatización de termoquimiólisis con TMAH es efectivo.

Y dada la reacción previa de derivatización por esterificación es de suponer que su ácido graso de origen sería el ácido hexanodecanoico. En 23,941 minutos se identifico el estándar interno de eicosano y como se nota es el pico más grande. Respecto a la comparación entre muestras y patrones en este último hay muchos mas componentes y en mayor cantidad (entre 24 y 32 minutos), lo que hace presumible que las concentraciones de compuestos que a continuación se listan y cuyo porcentaje de similitud según la librería NIST de la compañía Wiley fue superior al 85%, están en concentraciones de trazas (ppb o ppt):

El origen de muchos compuestos que contienen nitrógeno y azufre en muestras de MON aunque aún no es claro, si orienta sobre el carácter posible de sus precursores

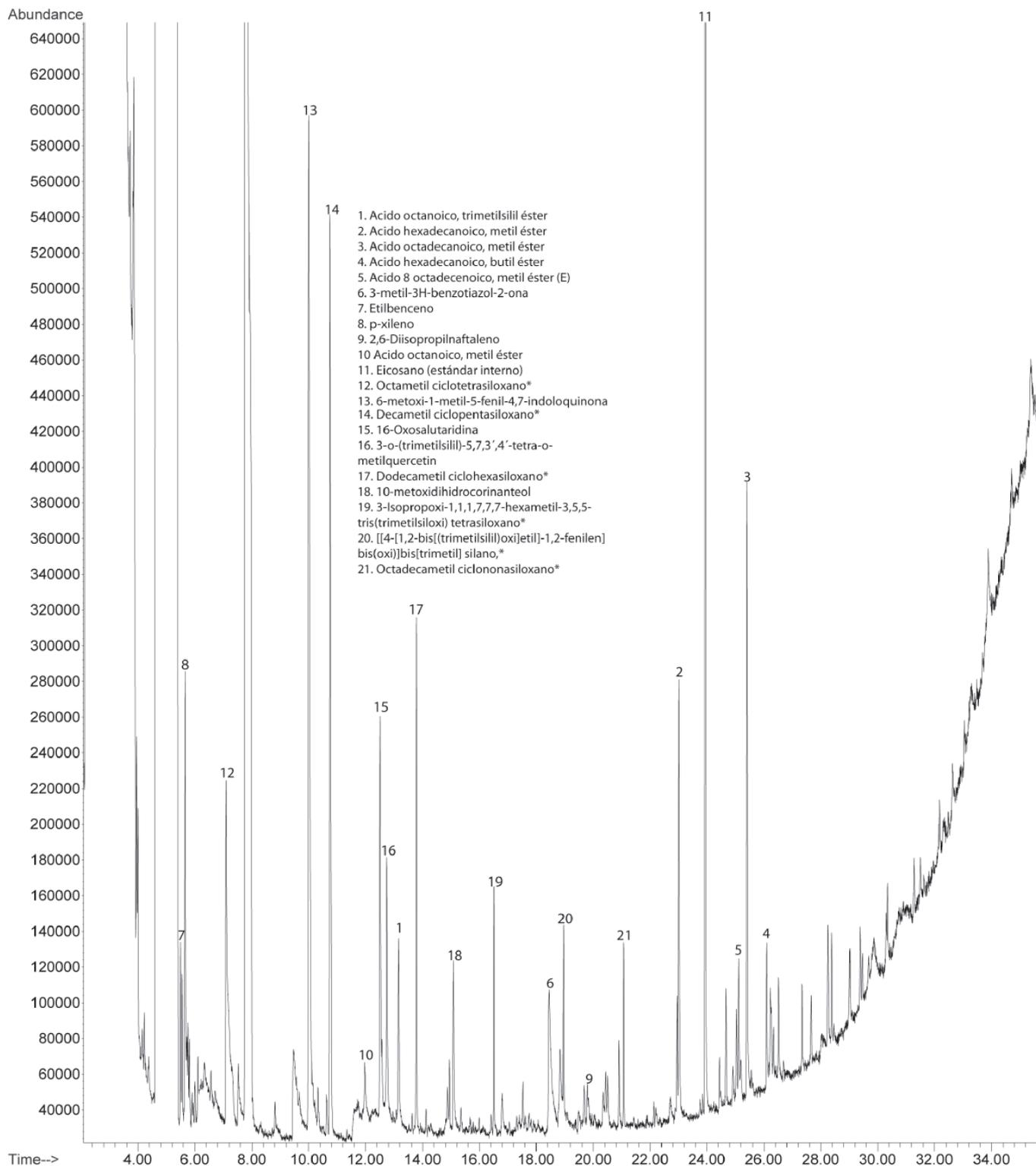
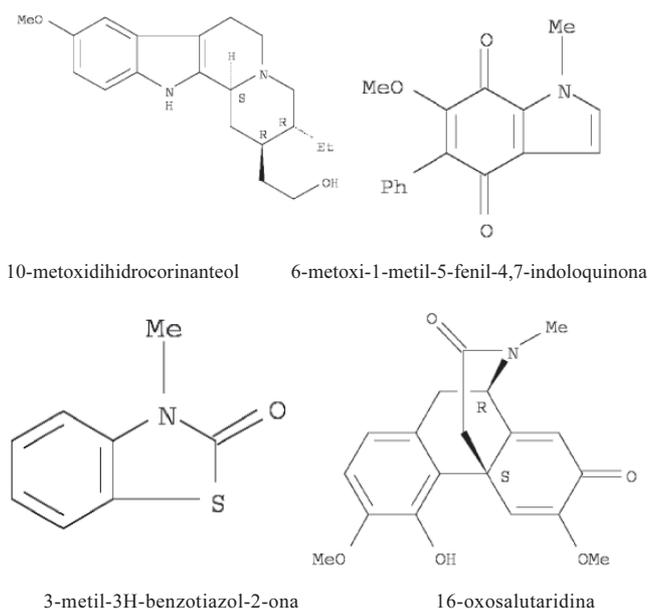


Figura 1. Espectro de masas TMAH GC-MS muestra liofilizada del río Pasto.

a partir de la reacción de termoquimiólisis con TMAH, en el caso de compuestos del tipo benzotiazol (tabla 1) es claro que su precursor es el dimetilsulfoniopropionato, base de muchos aminoácidos esenciales (Joll, C.A. 2004). Los compuestos conteniendo nitrógeno presentes en la muestra liofilizada de MON del río Pasto como los que aparecen en la figura 2 pueden ser derivados de proteínas mientras que otros han sido identificados como productos que no son fuente específica del procedimiento de la reacción de termoquimiólisis con TMAH realizada en este estudio como el correspondiente compuesto 6-metoxi-1-metil-5-fenil-4,7-indoloquinona (ver figura 2).

Los compuestos derivados del benceno (etilbenceno y xileno) (ver figura 1 y tabla 1) encontrados en estas muestras del río Pasto y en general en la MON de muestras de río ayudan a seguir especulando sobre el carácter y naturaleza de aromaticidad en la estructura de la MON, y cuyo origen puede encontrarse de las proteínas, lignina, carbohidratos y taninos. Muy concretamente el compuesto polihidroxiaromático de quercetin (figura 1 pico 16) corresponde a un pigmento natural de plantas (Joll, C.A. 2004) y que también evidencia que la reacción de derivatización es efectiva. Los demás compuestos relacionados con familias de alcoholes, azufrados y alifáticos tendrían algún origen de derivados de proteínas.



**Figura 2.** Estructuras de compuestos nitrogenados presentes en la MON del río Pasto.

Se presenta un método potente y robusto para el análisis de la materia orgánica natural, cuyos resultados develan la gran complejidad de compuestos que se encuentran en el agua del río Pasto (preliminarmente se identificaron mas

**Tabla 1.** Principales compuestos identificados en muestras liofilizadas del río Pasto por Termoquimiólisis GC-MS.

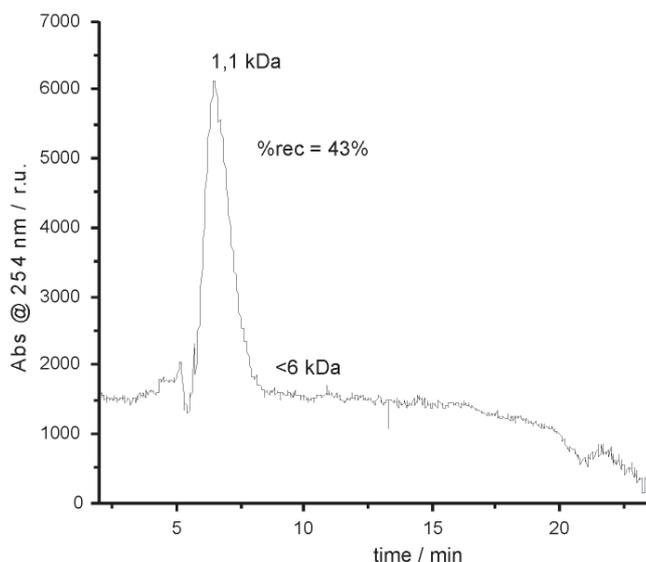
Item	Compuesto	t <sub>R</sub> /min	Pico base/umas
<b>Aromáticos</b>			
1	Etilbenceno	5.505	91
2	p-Xileno	5.671	91
<b>FAME<sup>2</sup></b>			
3	Acido acético, etil éster	2.654	43
4	Acido octanoico, trimetilsilil éster	13.153	73
5	Acido hexadecanoico, metil éster	23.011	74
6	Acido octadecanoico, metil éster	25.412	74
7	Acido hexadecanoico, butil éster	26.086	56
8	Acido 8 octadecenoico, metil éster (E)	25.124	55
9	Acido hexanodioico, dioctil éster	28.247	129
<b>Conteniendo Nitrógeno</b>			
10	6-metoxi-1-metil-5-fenil-4,7-indoloquinona	10.008	267
11	16-oxosalutaridina	12.511	341
12	10-metoxidihidrocorinanteol	15.084	327
<b>Conteniendo grupos OH</b>			
13	2-metilpentan-1-ol	3.114	43
<b>Conteniendo Azufre</b>			
14	3-metil-3H-benzotiazol-2-ona	18.459	136
<b>Cadenas alifáticas</b>			
15	2-etil-1-hexeno	26.514	70

<sup>2</sup> FAME: ésteres metílicos de ácidos grasos.

de 40 compuestos agrupados en 6 familias químicas importantes) y cuyas fuentes en general tiene causas naturales y que se discriminan los posibles orígenes de cada tipo de familias, y que requiere su observación juiciosa en el momento de eliminación porque la incidencia en la calidad del producto final es total.

### Lecturas por AsFIFFF

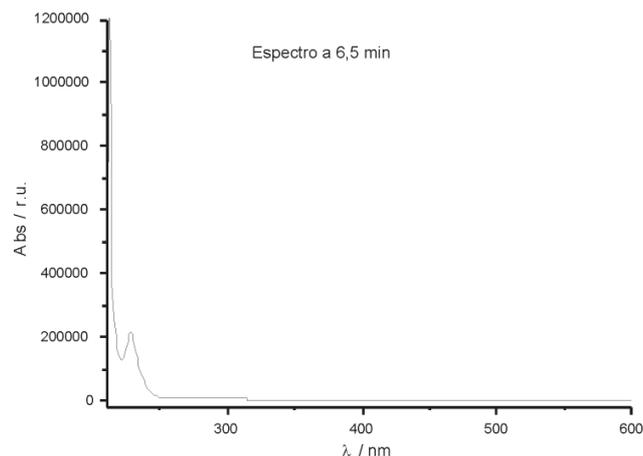
Se inyectó la muestra (volumen 100  $\mu$ L) en el sistema de separación AsFIFFF acoplado a un detector UV-Vis de arreglo de diodos. Los resultados del análisis se muestran a continuación:



**Figura 3.** Fractograma muestra liofilizada del río Pasto.

La muestra contiene materia orgánica en el rango de hasta 5-6 kDa [tamaños en función de la calibración hecha frente a estándares de tamaño de poliestersulfonas (PSS)]. El hecho de que el máximo aparezca a una masa de 1,1 kDa se debe al uso de una membrana de permeación de un tamaño de poro de 1 kDa, por lo que especies de menor tamaño son filtradas a través de la misma y no es posible su caracterización. El porcentaje de este tipo de especies de bajo peso molecular puede estar próximo al 50-60% de acuerdo a la recuperación obtenida (calculada a partir del área del pico de la muestra sin pasar por el canal, y el área del pico del fractograma obtenido a 254 nm). Se adjunta el espectro de absorción en el máximo del pico del fractograma.

El 43% de los compuestos tienen un peso entre 5 y 6 kDa, denotando la presencia de compuestos de alto peso molecular con anillos aromáticos y cadenas carbonadas saturadas extremadamente complejas donde prevalece una



**Figura 4.** Espectro de absorción UV-VIS muestra liofilizada del río Pasto.

mezcla de moléculas orgánicas que abarcan una gran variedad de pesos moleculares.

Resulta contundente en la elucidación de las características químicas y de composición de la MON del río Pasto, el máximo de absorción obtenido en la muestra a 254 nm, donde normalmente estos compuestos tienen su máximo de absorción típico de estas sustancias húmicas y fúlvicas, debido a su constitución de sistemas p-conjugados con alta aromaticidad y ricos en grupos cromóforos que absorben en el ultravioleta visible.

### Lecturas por ICP-MS

De los cuatro iones evaluados de especial interés resultaron con concentraciones importantes el hierro y el cromo ( $\text{Fe}^+$  2149.9 ppm;  $\text{Cr}^+$  26,4 ppm) en tanto que iones como cadmio y plomo mostraron niveles por debajo del límite de detección de la técnica que bordean los 0,6 y 6 ppb respectivamente. Este contenido de hierro y la reconocida capacidad acomplejante de la materia orgánica (Laborda, F. 2008; Laborda, F. 2009) en especial de compuestos fenólicos y aromáticos presentes en estas muestras podrían explicar la constante aparición de color rojizo en las aguas del río Pasto. La presencia de cromo puede estar relacionada con el aporte de la microindustria artesanal de la curtiembre y marroquinería que se asienta a la vera del río y hacen sus descargas sin controles efectivos.

### Conclusiones

A pesar que la caracterización fue preliminar y cualitativa, confrontando todos los resultados que se obtuvo por diferentes técnicas, (termoquimiólisis-GC/MS, AsFIFFF

y ICP-MS) y aunque no hay un referente de este tipo de análisis en esta muestra del río Pasto frente a la determinación de compuestos por CG, ni de su ambiente protónico o de sus pesos moleculares como tal, si se esperaba unos rangos de masa entre 5 y 6 kDa, atendiendo que las mayoría de compuestos encontrados tras el análisis de termoquimiólisis fueron ácidos carboxílicos, compuestos nitrogenados, compuestos fenólicos y algunos aromáticos, entre otros y todos de origen natural, además que la influencia de la zona por sus suelos volcánicos ricos en piritita pueda ser la razón de la coloración rojiza de las aguas debido a los complejos coloreados que se estarían formando algunos constituyentes de la MON con el hierro en solución imprimiéndole color a las aguas del orden de 40-120 UPC (Galeano L.A. 2011).

### Agradecimientos

M. Rosero-Moreano expresa agradecimientos al personal de laboratorio de las instituciones CENICAFÉ (Colombia) y Universidad de Zaragoza (España) por la liofilización, y toma de fractogramas sin ningún costo y muy especialmente a los Doctores Iñaqui Delso y Eduardo Bolea del Departamento de Química de la Universidad de Zaragoza-España por toda la ayuda recibida. Igualmente a COLCIENCIAS por la financiación del proyecto código 1127-489-25606.

### Referencias bibliográficas

- Beckett, R. 1987. "Determination of molecular weight distributions of fulvic and humic acids using flow field-flow fractionation." *Environmental Science Technology* **21**(3):289-295.
- Challinor, J. M. 1995. "Characterisation of wood by pyrolysis derivatisation-gas chromatography/mass spectrometry." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **35**:93-107.
- Chamorro-Bolaños, X. 2009. "Determinación de precursores orgánicos y trihalometanos en agua para consumo humano de la planta Centenario de la ciudad de Pasto. Pasto, Universidad de Nariño. Química: 111.
- \_\_\_\_\_, Enríquez, A.; Rodríguez, G.; Rosero-Moreano, M. 2010. "Montaje y validación del método de análisis de combustión y detección por infrarrojo no dispersivo para determinación de carbón orgánico total (COT) en agua." *Revista Luna Azul* (30):1909-2474.
- Chen, J.; Gu, B.; LeBoeuf, E.; Pan, H.; Dai, S. 2002. "Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions" *Chemosphere* **48**:59-68.
- Christy, A.A.; Bruchet, A.; Rybacki, D. 1999. "Characterization of natural organic matter by pyrolysis/GC-MS" *Environment International* **25**:181-189.
- Del Rio, J.C.; McKinney, D.E.; Knicker, H.; Nanny, M.A.; Minard, R.D.; Hatcher, P.G. 1998. "Structural characterization of bio- and geo-macromolecules by off-line thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide." *Journal of Chromatography A* **823**:433-448.
- Frazier, S.W.; Nowak, K.O.; Goins, K.M.; Cannon, F.S.; Kaplan, L.A.; Hatcher, P.G. 2003. "Characterization of organic matter from natural waters using tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis GC-MS." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **70**:99-128.
- Galeano, L.A.; Bravo, P. F.; Luna, C.; Vicente, M.A.; Gil, A.; Rosero-Moreano, M.; Delgado, S.X; Rodríguez, G. 2011. "Removal of natural organic matter from a surface feedstock for drinking water production by Al/Fe-PILC - catalysed wet peroxide oxidation". Valladolid, International Water Association Conference.
- Joll, C.A.; Couton, D.; Heitz, A.; Kagi, R. 2004. "Comparison of reagents for off-line thermochemolysis of natural organic matter." *Organic Geochemistry* **35**:47-59.
- Kowalkowski, T.; Buszewski, B.; Cantado, C.; Dondi, F. 2006. "Field-Flow Fractionation: theory, techniques, applications and the challenges." *Critical reviews in analytical chemistry* **36**:129-135.
- Laborda, F.; Bolea, E.; Górriz, M.P.; Martín-Ruiz, M.P.; Ruiz-Beguiría, S.; Castillo, J.R. 2008. "A speciation methodology to study the contributions of humic-like and fulvic-like acids to the mobilization of metals from compost using size exclusion chromatography-ultraviolet absorption-inductively coupled plasma mass spectrometry and deconvolution analysis" *Analytica Chimica Acta* **606**(1):1-8.
- \_\_\_\_\_, Ruiz-Beguiría, S.; Bolea, E.; Castillo, J.R. 2009. "Functional speciation of metal-dissolved organic matter complexes by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and deconvolution analysis" *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **64**(5):392-398.
- Lehtonen, T.; Peuravuori, J.; Pihlaja, K. 2000. "Characterisation of lake-aquatic humic matter isolated with two different sorbing solid techniques: tetramethylammonium hydroxide treatment and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry." *Analytica Chimica Acta* **424**:91-103.
- Mannino, A.; Rodger-Harvey, H. 2000. "Terrigenous dissolved organic matter along an estuarine gradient and its flux to the coastal ocean." *Organic Geochemistry* **31**:1611-1625.
- Matilainen, A.; Sillanpää, M. 2010. "Removal of natural organic matter from drinking water by advanced oxidation processes." *Chemosphere* **80**:351-365.
- Pavel, J. 2003. "Separation methods in the chemistry of humic substances." *Journal of Chromatography A* **983**:1-18.
- Specht, C.H.; Kumke, M.U.; Frimmel, F. H. 2000. "Characterization of NOM adsorption to clay minerals by size exclusion chromatography." *Water Research* **34**:4063-4069.
- Wu, F.C.; Evans, R.D.; Dillon, P.J.; Cai, Y.R. 2007. "Rapid quantification of humic and fulvic acids by HPLC in natural waters." *Applied Geochemistry* **22**:1598-1605.

Recibido: julio 18 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.



# ESTUDIO COMPARATIVO POR ELECTROFORESIS CAPILAR Y CROMATOLOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA DE CATEQUINAS EXTRAÍDAS DE CINCO VARIEDADES DE CACAO COLOMBIANO

Mónica Cala, Ángela Vásquez, Alejandro García, Jairo René Martínez,  
Elena Stashenko<sup>1</sup>

## Resumen

**Cala, M., A. Vásquez, A. García, J. R. Martínez, E. Stashenko:** Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de cinco variedades de cacao colombiano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **35** (136): 371-379, 2011. ISSN 0370-3908.

Se implementaron metodologías de análisis por electroforesis capilar (CE) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la separación y cuantificación de ( $\pm$ )-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, galato de (-)-epicatequina y galato de (-)-epigallocatequina, en 5 muestras de 3 variedades de cacao cultivadas en Colombia. La técnica de HPLC fue más reproducible que la CE, que sin embargo, resultó ser más rápida, económica y menos contaminante. Se cuantificaron, por HPLC y CE (estándar externo), ( $\pm$ )-catequina (0,07-0,79 mg/g de cacao) y (-)-epicatequina (1,99-9,66 mg/g de cacao) en los extractos acuosos de las tres variedades de cacao.

**Palabras clave:** catequinas, CE, HPLC, *Theobroma cacao*.

## Abstract

Analytical methodologies based on capillary electrophoresis (CE) and high performance liquid chromatography (HPLC) were implemented for the separation and quantitation of ( $\pm$ )-catechine, (-)-epicatechine, (-)-epigallocatechine, (-)-epicatechine gallate and (-)-epigallocatechine gallate in 5 samples of 3 cacao varieties grown in Colombia. HPLC was found to be more reproducible than CE, which turned out to be faster, more economical and less contaminant. ( $\pm$ )-Catechine (0,07-0,79 mg/g cacao) and (-)-epicatechine (1,99-9,66 mg/g cacao) were determined in aqueous extracts of the 3 cacao varieties.

**Key words:** catechines, CE, HPLC, *Theobroma cacao*.

<sup>1</sup> Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CIBIMOL, Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Carrera 27, Calle 9, Bucaramanga, Colombia. Correo electrónico: elena@tucan.uis.edu.co

## Introducción

El gran interés en el consumo de productos como chocolate y té, en los hábitos alimenticios de diferentes países, se atribuye a su contenido de compuestos fenólicos (Folch-Cano, C. *et al.* 2010; Yilmaz, 2006), entre los cuales se destacan ( $\pm$ )-catequina [ $\pm$ -C], (-)-epicatequina [(-)-EC], (-)-epigallocatequina [(-)-EGC], galato de (-)-epicatequina [(-)-ECG] y galato de (-)-epigallocatequina [(-)-EGCG], por su efecto antioxidante, ampliamente estudiado (Tsao y Deng, 2004; Putte y Hollman, 2000; Rice-Evans, 1996).

La implementación de metodologías que permitan la determinación y cuantificación de catequinas en muestras vegetales, es de importancia para tareas de bioprospección, desarrollo de ingredientes para las industrias farmacéutica, de alimentos y cosmética, para el control de calidad, y muchas otras aplicaciones. El desarrollo de técnicas instrumentales, que logren de manera rápida y eficaz la determinación de compuestos polares y no-volátiles, tales como la electroforesis capilar y la cromatografía líquida de alta eficiencia, ha resultado de gran utilidad para la identificación y cuantificación rápida de diversos tipos de catequinas, en matrices con diferentes características (Castro, M. *et al.* 2011; Calderón, A. *et al.* 2009). Aunque ambas técnicas han mostrado excelentes resultados en cuanto a la separación de catequinas, la discusión sobre cuál de las dos resulta más adecuada continúa abierta, ya que cada una presenta diferentes ventajas y desventajas, tal como lo muestran algunas publicaciones sobre el estudio comparativo de estas técnicas analíticas (Valls, J. *et al.* 2009; Bowser, M. *et al.* 2010; Dalluge y Nelson, 2000).

En el presente trabajo, se implementaron metodologías para la cuantificación de catequinas en cacao (variedades ICS-39, TSH-565 e IMC-67), basadas en las técnicas analíticas de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y electroforesis capilar (CE).

## Parte experimental

**Material vegetal.** Una muestra de cacao ICS-39, 2 muestras de la variedad TSH-565 y 2 muestras de la variedad IMC-67 fueron colectadas en la vereda El Rincón, a 6 km, sobre la vía que comunica con el municipio del Socorro (Santander). Las semillas de cada variedad fueron retiradas del fruto y posteriormente despulpadas. Luego de tres lavados sucesivos, se secaron a 30°C durante una semana hasta alcanzar peso constante. Por último, las semillas se maceraron y se almacenaron a temperatura ambiente en recipientes plásticos rotulados.

**Material de referencia y reactivos.** El material de referencia certificado de las catequinas ( $\pm$ -C (99%), (-)-EC (99%), (-)-EGC (99%), (-)-ECG (98%) y (-)-EGCG (95%), empleadas para la calibración, fue suministrado por *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EE.UU.). Agua, metanol, acetonitrilo grado HPLC, ácido clorhídrico (37% p/v) y cloroformo fueron adquiridos de J.T Baker (México D.C., México); ácido acético (98%) y acetato de etilo (99,8%) fueron obtenidos de Riedel-de Haën (Seelze, Suiza).

**Preparación de las soluciones estándar.** La solución madre (500 ppm), se preparó disolviendo ( $\pm$ -C (0,50 mg), (-)-EC (0,50 mg), (-)-EGC (0,50 mg), (-)-ECG (0,50 mg) y (-)-EGCG (0,50 mg) en agua grado HPLC (1,0 mL). Las soluciones de trabajo para la curva de calibración se prepararon a partir de la solución madre, en el rango de 0,5 a 64 ppm.

**Preparación de la muestra.** Semillas de cacao en polvo (100 mg) se trataron con hexano (10 mL) y se centrifugación (3000 rpm/10 min). Se retiró el hexano y se secó la muestra con corriente de nitrógeno. Seguidamente, se agregó agua grado HPLC (10 mL), y se agitó la suspensión con ultrasonidos (15 min). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min. El extracto acuoso obtenido, fue sometido a dos extracciones líquido – líquido sucesivas, primero, con cloroformo (10 mL) y después, con acetato de etilo (10 mL). De la primera extracción se tomó la fase acuosa y de la segunda extracción, se conservó la fracción orgánica. Finalmente, esta fracción se llevó a sequedad con corriente de nitrógeno y, el extracto después de pesado, se disolvió en agua grado HPLC y se aforó a 1,0 mL para su posterior análisis.

**Análisis cromatográfico.** El análisis cromatográfico se realizó usando un cromatógrafo líquido *Agilent Technologies 1200 Series* (Miami, FL, EE.UU.), que consta de un inyector manual *Agilent Technologies 1200 G1328B*; una bomba cuaternaria, *Agilent Technologies G1354A*; un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD), *Agilent Technologies G1315B*, usado para determinar la pureza del pico cromatográfico. La identificación e integración de picos se realizó a través del *software Agilent ChemStation (G1701-DA)*. La separación cromatográfica se realizó con un guarda-columna *Agilent Technologies ECLIPSE XDB-C18 (4,6 x 12,5 mm, 5  $\mu$ m)* y una columna apolar, *ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m)*. La temperatura de la columna se mantuvo en 35°C. La detección de las cinco catequinas fue realizada a una longitud de onda de 210 nm. La fase móvil seleccionada fue una mezcla de dos solventes, (A) metanol y (B) agua:ácido acético (100:0,1). La cromatografía isocrática se desarrolló con flujo de 1 mL/min y una relación A:B (18:82).

Para el análisis por electroforesis capilar se empleó un equipo Lumex modelo CAPEL 105 (San Petersburgo, Rusia), con detector UV (190 – 380 nm), un capilar de sílice fundida de 75  $\mu\text{m}$  i.d., con largo total y efectivo de 60 y 50.5 cm, respectivamente, y una fuente de poder con polaridad positiva. El tratamiento de los datos obtenidos utilizó el *software Chromatography Data Station, Chrom&Spec*, Versión 1.5. La solución *buffer* empleada fue una mezcla de ácido bórico (35 mM), dihidrógeno fosfato de sodio (20 mM) y dodecil sulfato de sodio (80 mM). La separación electroforética se realizó a 20 kV y 20°C durante 14 min. La detección se realizó a 210 nm. Para el acondicionamiento diario del capilar, al inicio de cada jornada, se realizó un lavado con agua (3 min), metanol (3 min), ácido clorhídrico (5 min) e hidróxido de sodio (15 min) y para el lavado entre corridas se empleó la misma solución *buffer* descrita anteriormente (5 min).

**Implementación de los métodos de análisis.** Para el análisis simultáneo por HPLC de ( $\pm$ )-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, se probaron las siguientes condiciones de análisis: longitud de onda (rango 190 a 900 nm); composición de fase móvil (metanol:agua, metanol:acetonitrilo, metanol:agua:ácido acético, metanol:agua:ácido fosfórico y acetonitrilo:agua (Her y Koel, 2003; Auger *et al.*, 2004; Nishitani y Sagesaka, 2004) y temperatura (30, 35 y 40°C). Con lo determinado en las pruebas preliminares y, para establecer las mejores condiciones de análisis, se realizó un diseño experimental central compuesto  $3^3$ . Las variables consideradas fueron: porcentaje de metanol (15, 18 y 20%), cantidad de ácido acético en agua (0, 0,1 y 0,3%) y temperatura (30, 35 y 40°C).

En el análisis de catequinas por CE se evaluaron diferentes condiciones, a saber: composición de la solución *buffer*, pH de esta solución, voltaje y temperatura. Se realizó un diseño experimental factorial  $3^2$  para evaluar el efecto que tuvieron sobre la resolución las concentraciones de los componentes de la solución *buffer*, ácido bórico (25, 35 y 45 mM), dihidrógeno fosfato de sodio (20 mM) y dodecil sulfato de sodio (60, 80 y 100 mM).

## Discusión de resultados

**Implementación de las metodologías de análisis de catequinas.** Para la implementación de la metodología de análisis de catequinas por HPLC, se seleccionó la longitud de onda para el máximo de absorbancia de las catequinas a 210 nm.

Para seleccionar la composición de la fase móvil se realizaron pruebas variando los solventes de menor a mayor fuerza de elución, es decir, agua, metanol y acetonitrilo. Se evaluaron diferentes mezclas de solventes, a saber:

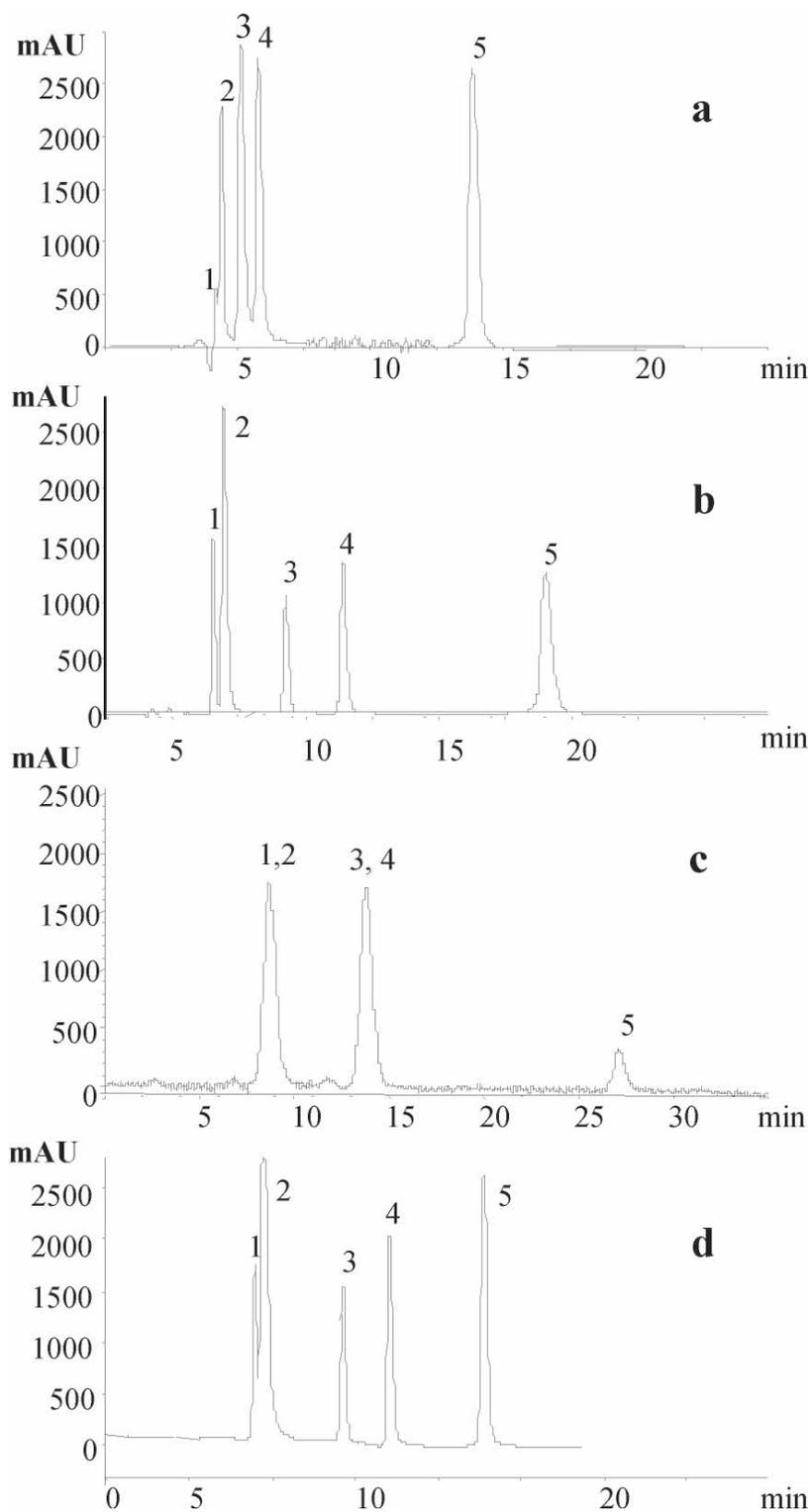
metanol:agua, metanol:acetonitrilo, metanol:agua:ácido acético, metanol:agua:ácido fosfórico y acetonitrilo:agua (Figura 1).

Al emplear la fase móvil con mayor porcentaje de agua, se observó la separación de los cinco analitos, aunque el valor de resolución no fue completamente aceptable para los picos cromatográficos 1 y 2 (Figura 1). Con el propósito de reducir los tiempos de análisis, se evaluaron mezclas de solventes con menor retención, a saber: acetonitrilo:agua y acetonitrilo:metanol. Aunque se lograron tiempos de análisis más cortos, la resolución disminuyó drásticamente y se presentó la coelución de algunos picos.

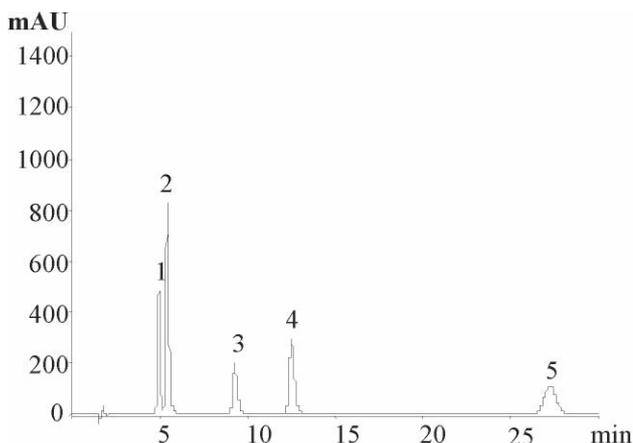
La fase móvil con la que se obtuvo la resolución más alta, fue agua:metanol:ácido acético. Una vez establecida la composición de la fase móvil, se efectuó un diseño experimental central compuesto  $3^3$  para estudiar el efecto del porcentaje de metanol, cantidad del ácido acético y la temperatura del termostato.

El valor máximo de la variable de respuesta (resolución) en el diseño experimental central compuesto  $3^3$ , se logró con 18% de metanol; 82% de agua:ácido acético (100:0.1) y la temperatura de 35 °C. En la Figura 2, se muestra un perfil cromatográfico típico de la mezcla patrón de ( $\pm$ )-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, obtenido bajo las condiciones descritas anteriormente.

Para la implementación de la metodología de electroforesis capilar, se realizaron pruebas preliminares para determinar cuáles eran las variables que afectaban en mayor grado la separación de las cinco catequinas bajo estudio. De acuerdo con estos resultados, se determinó que los principales parámetros a evaluar en el diseño de experimentos eran los correspondientes a la composición de la fase móvil. Dado el carácter no iónico de las catequinas, se empleó como modalidad de electroforesis la llamada cromatografía electrocinética micelar (MEKC) (Kartsova y Ganzha, 2006); se utilizó como surfactante el dodecil sulfato de sodio (SDS), se probaron diferentes sustancias como componentes de la solución *buffer*, *e.g.* ácido bórico, tetraborato de sodio y dihidrógeno fosfato de sodio; se observó la separación parcial de las cinco catequinas (Figura 3). Teniendo en cuenta que la solución compuesta por la mezcla de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{H}_3\text{BO}_3$  mostró los mejores resultados, se procedió a evaluar en un diseño de experimentos  $3^2$  el efecto de la concentración de ácido bórico y SDS en la solución *buffer*, manteniendo fija la concentración de dihidrógeno de sodio en la menor cantidad necesaria para lograr la separación de las 5 catequinas y evitar la posible precipitación de sales al interior del capilar por interacción de esta sustancia con metanol.



**Figura 1.** Perfiles cromatográficos de la mezcla de catequinas patrón, obtenidos con fases móviles de diferente composición. **a)** metanol:acetonitrilo 20:80 **b)** 20: 80 metanol:agua (agua:ácido acético 100:0.1) **c)** 20: 80 metanol:agua (agua:ácido fosfórico 100:0.1) **d)** acetonitrilo:agua (agua:ácido acético 100: 0.1) a 40°C. Flujo 1 mL/ min.



**Figura 2.** Perfil cromatográfico de la mezcla patrón de catequinas ( $\pm$ )-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-EGCG y (-)-EGCG, obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Fase móvil: 20 % metanol: 80% agua:ácido acético (100:0.1), temperatura: 25°C, flujo: 1 mL/min. 1. (-)-EGC, 2. ( $\pm$ )-C, 3. (-)-EGCG, 4. (-)-EC, 5. (-)-EGCG.

Como resultado del diseño experimental, en el que la variable de respuesta a evaluar fue la resolución entre los picos 1 y 2, se obtuvo que la solución *buffer* compuesta por dihidrógeno fosfato de sodio (20 mM), ácido bórico (35 mM) y SDS (80 mM) produjo la mejor separación. En la Figura 4 se presenta un electroforegrama de la mezcla de

las cinco catequinas bajo estudio, obtenido empleando la metodología descrita. Los valores de parámetros como el voltaje aplicado al capilar (20 kV), el pH de la solución buffer (pH = 8,24) y la temperatura de análisis (20°C), se mantuvieron fijos.

**Estudio comparativo entre las técnicas HPLC y CE.** El estudio comparativo de las metodologías implementadas para la determinación de catequinas, se realizó teniendo en cuenta las figuras analíticas de mérito, el tiempo y el costo de análisis.

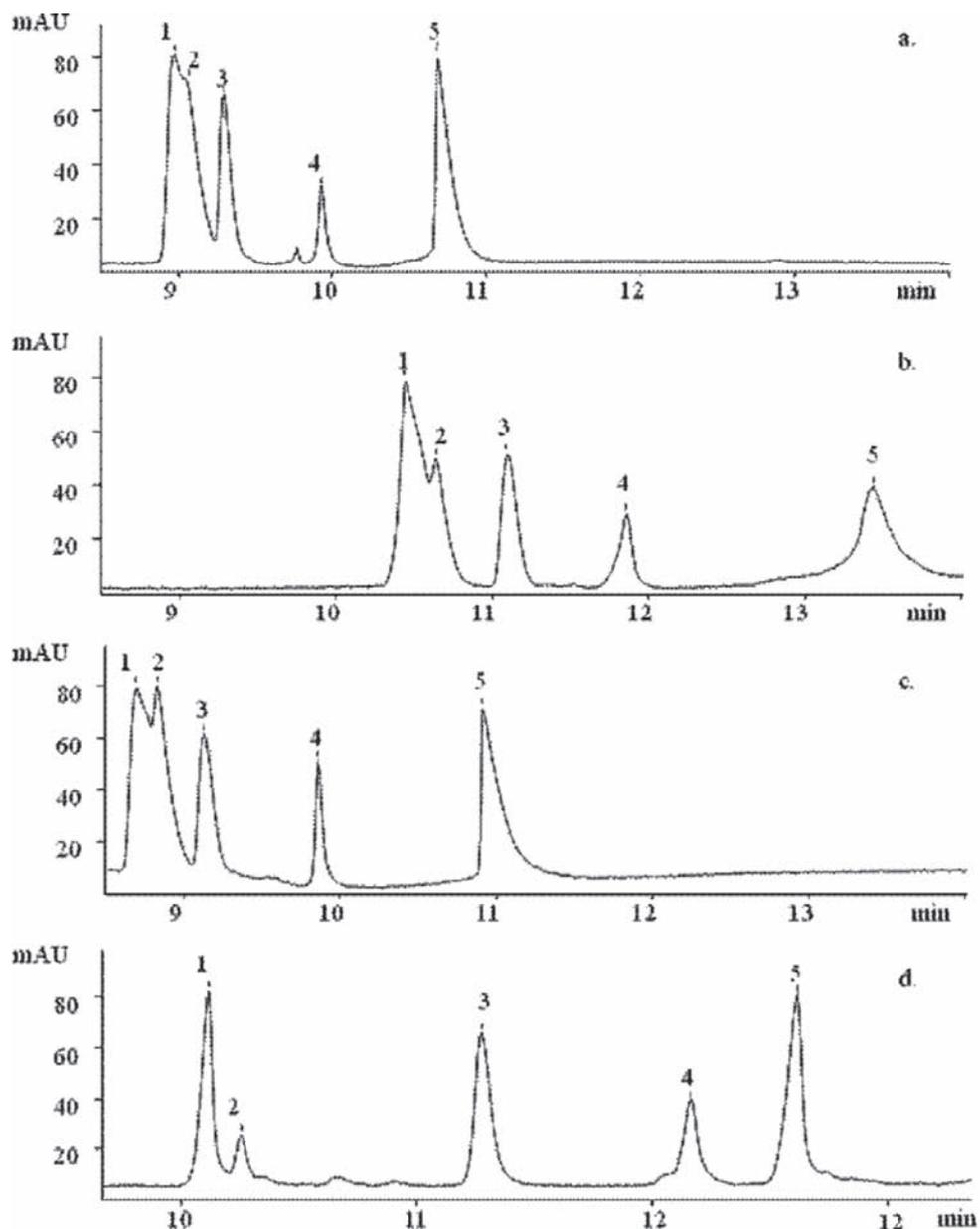
Las siguientes fueron las figuras analíticas de mérito determinadas: precisión (expresada como repetibilidad en tiempo de retención y área), porcentaje de recuperación, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad (coeficiente de determinación) y sensibilidad (pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95%). Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron más bajos para HPLC excepto para la (-)-EGCG. En general, para CE los LOD obtenidos, fueron más del doble de los encontrados para HPLC. Los mejores valores en cuanto a linealidad del método, evaluada en el rango de 0,5 a 64 mg/L, se obtuvieron con HPLC. De manera similar, la sensibilidad asociada con la respuesta del detector, fue mayor para todas las catequinas en el DAD del equipo de HPLC em-

**Tabla 1.** Figuras analíticas de mérito de los métodos basados en HPLC y CE para la determinación de catequinas.

Analito	Tiempo (min) $\pm s$	Área (mAU s) $\pm s$	Repetibilidad d, CV		Reproducibilidad, CV		Linealidad y sensibilidad		LOD, mg/L	LOQ, mg/L	N
			$t_R$	Áreas	$t_R$	Áreas	$R^2$	b			
<b>(-)-EGC</b>											
HPLC	4,74 $\pm$ 0,04	3130 $\pm$ 20	0,77	0,64	0,48	4,4	0,9998	96,5	0,50	1,00	16970
CE	10,3 $\pm$ 0,1	95 $\pm$ 3	0,97	3,3	0,43	3,7	0,9993	0,972	1,37	2,75	110621
<b>(<math>\pm</math>)-C</b>											
HPLC	5,19 $\pm$ 0,04	3660 $\pm$ 32	0,76	0,88	0,30	5,7	0,9998	126,6	0,46	0,92	17004
CE	10,6 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,4	1,9	0,9	0,46	5,6	0,9987	1,14	1,81	3,62	115578
<b>(-)-EGCG</b>											
HPLC	8,86 $\pm$ 0,08	3870 $\pm$ 29	0,90	0,75	0,70	5,3	0,9998	115,1	0,56	1,12	17719
CE	11,90 $\pm$ 0,06	230 $\pm$ 8	1,0	2,3	0,46	3,6	0,9991	0,693	1,48	2,96	84393
<b>(-)-EC</b>											
HPLC	11,87 $\pm$ 0,09	2430 $\pm$ 60	0,75	2,5	0,53	4,8	0,9997	82,5	0,48	0,96	22923
CE	11,6 $\pm$ 0,1	69 $\pm$ 4	1,3	2,4	1,2	5,5	0,9975	1,2	2,55	5,10	65638
<b>(-)-EGCG</b>											
HPLC	25,9 $\pm$ 0,2	2600 $\pm$ 38	0,75	1,5	0,28	5,9	0,9999	101	1,84	3,68	24104
CE	12,1 $\pm$ 0,08	105 $\pm$ 4	1,0	2,1	0,65	3,6	0,999	1,47	1,61	3,22	74213

CV: Coeficiente de variación, LOD: Límite de detección, LOQ: Límite de cuantificación, N: Número de platos teóricos,  $t_R$ : Tiempo de retención, s: Desviación estándar.



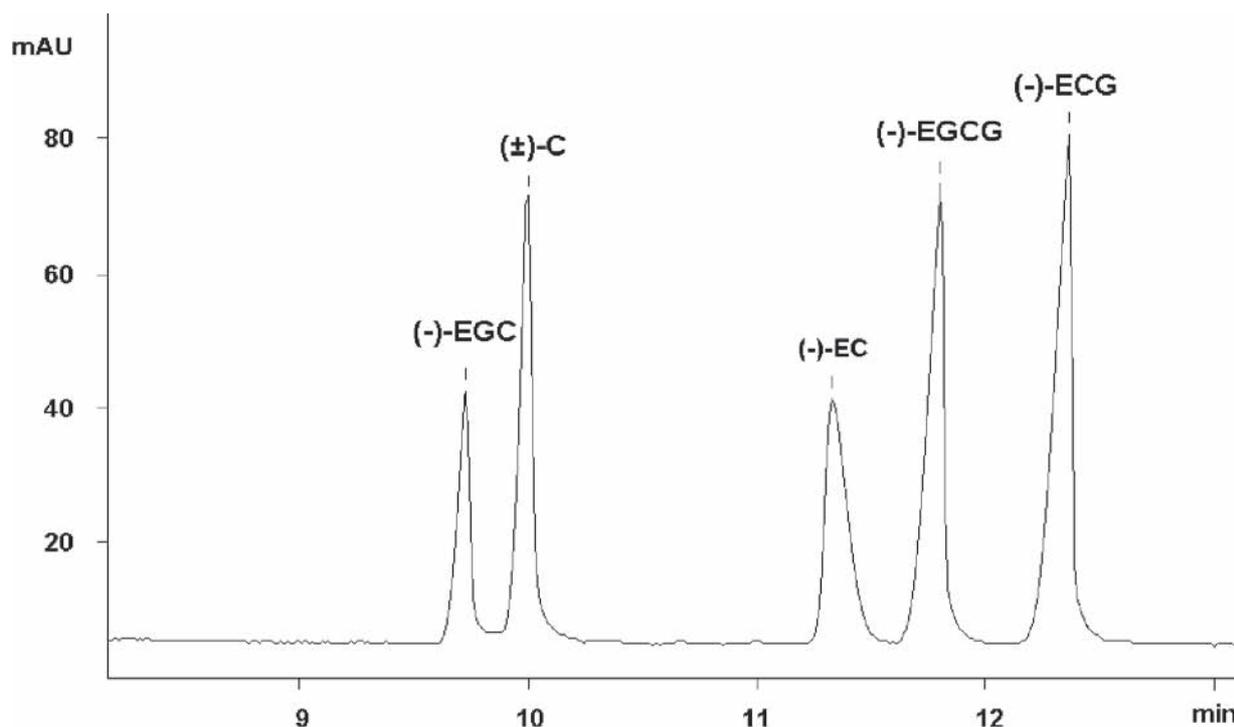
**Figura 3.** Electroforegrama de la mezcla de catequinas ( $\pm$ )-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG. **a.** SB:  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (25 mM), SDS (5 mM) pH: 8.24, **b.** SB:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (25 mM), SDS (5 mM) pH: 8.24, **c.** SB:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (25 mM), SDS (5 mM) pH: 8.24, **d.** SB:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (20 mM),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (25 mM) y SDS (5 mM) pH: 8.23

pleado. Lo anterior indica que, en el análisis de catequinas bajo las condiciones establecidas, la mayor repetibilidad se alcanza con HPLC, hecho que coincide con reportes previos (Vanhoenacker *et al.*, 2001; Nemenak *et al.*, 2006).

El método de HPLC fue más reproducible en cuanto a tiempos de retención y áreas, de acuerdo con los CV % observados. Entonces, se puede afirmar que en el análisis

de catequinas, las dos técnicas pueden emplearse para la cuantificación rutinaria de ( $\pm$ )-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, galato de (-)-epicatequina y galato de (-)-epigallocatequina, siguiendo las metodologías implementadas.

Aunque ambos métodos son eficientes para el análisis de las cinco catequinas, se observa que el tiempo de mi-



**Figura 4.** Electroforegrama de la mezcla de catequinas (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-EGCG y (-)-EGCG. Solución *buffer* (pH: 8.24): dihidrógeno fosfato de sodio (20 mM), ácido bórico (35 mM) y SDS (80 mM). Temperatura: 20°C. Voltaje: 20 kV.

**Tabla 2.** Cuantificación de (±)-C, (-)- EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG por CE y HPLC, en cinco muestras de tres variedades de cacao cultivadas encafé Colombia.

Analito	Contenido de catequinas, mg de catequina/g de semilla				
	ICS-39	IMC-67	IMC-67	TSH-565	TSH-565
<b>(-)-EGC</b>					
HPLC	ND <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND
CE	ND	ND	ND	ND	ND
<b>(±)-C</b>					
HPLC	0,07 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,79 ± 0,05	0,33 ± 0,03	0,19 ± 0,01
CE	0,06 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,76 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,17 ± 0,01
<b>(-)-EGCG</b>					
HPLC	ND	ND	ND	ND	ND
CE	ND	ND	ND	ND	ND
<b>(-)-EC</b>					
HPLC	1,99 ± 0,02	5,29 ± 0,02	9,66 ± 0,08	6,48 ± 0,05	4,33 ± 0,03
CE	1,8 ± 0,2	5,1 ± 0,2	9,0 ± 0,4	6,1 ± 0,2	3,8 ± 0,1
<b>(-)-ECG</b>					
HPLC	ND	ND	ND	ND	ND
CE	ND	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup> ND: No detectado.

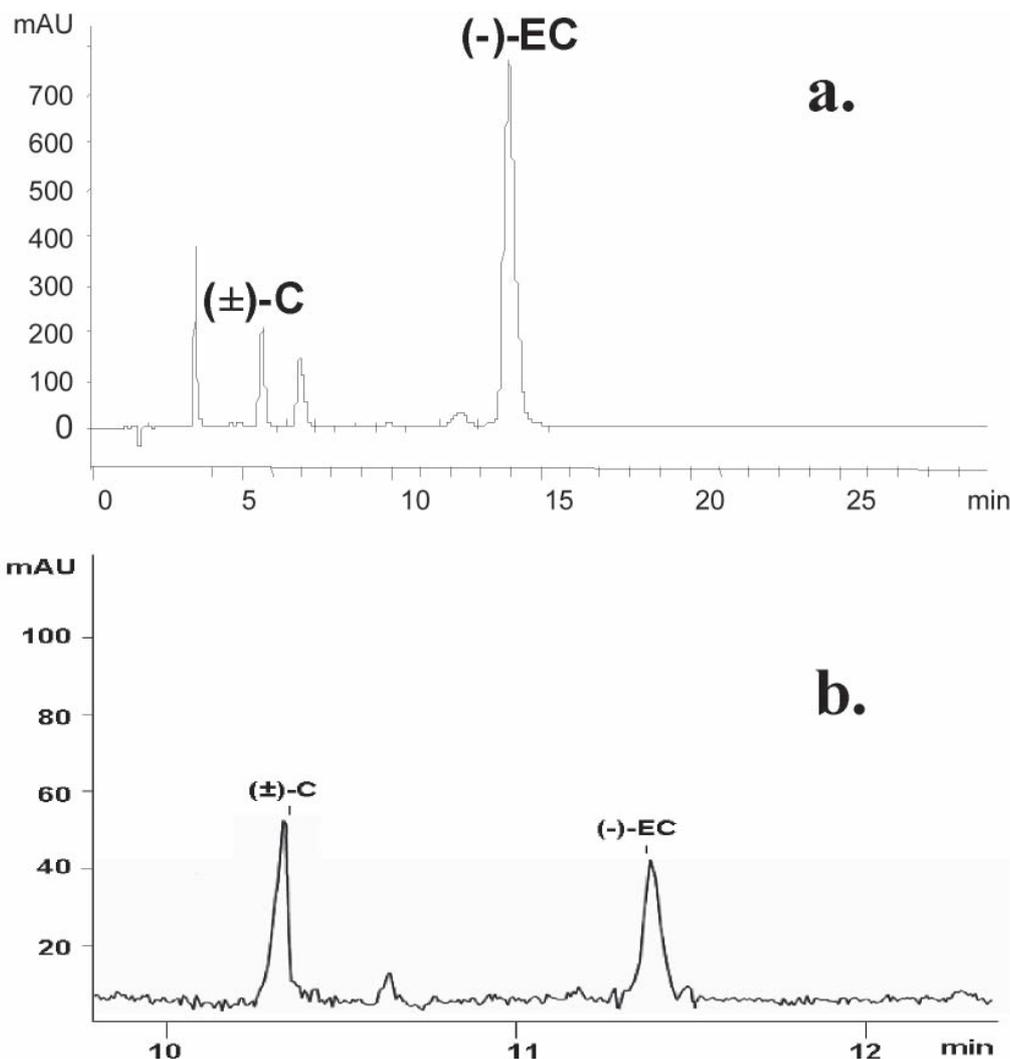


Figura 5. Perfiles cromatográficos del extracto acuoso de la variedad TSH-565 de *Theobroma cacao*. a. HPLC b. CE.

gración electroforético, para todas éstas, fue más corto (ca. 12 min), que el tiempo de retención (ca. 26 min), por HPLC. Sin embargo, para las primeras cuatro catequinas estudiadas por HPLC el tiempo fue menor que para CE (ca. 11 min). Por tanto, en cuanto al tiempo de análisis, la selección entre las dos técnicas empleadas, estará establecida por cuáles analitos se requiere determinar.

El costo de análisis de las cinco catequinas en una muestra llega a ser mucho mayor por HPLC, debido a que se emplea un volumen hasta 60 veces mayor de solventes que en CE; además, el tiempo de análisis más largo representa costos más altos por uso del equipo y el tiempo del operador. Consecuentemente, HPLC presenta grandes desventajas desde los puntos de vista económico y ambien-

tal, dados los altos costos de los solventes grado HPLC, tiempo de análisis y los problemas inherentes a la disposición de residuos químicos.

La metodología implementada por CE resultó ser bastante reproducible, repetible y sensible; sin embargo, no supera en estos tres aspectos a la que utiliza HPLC. No obstante, la técnica HPLC resultó ser menos ventajosa en cuanto a tiempos de análisis y costos. Por lo tanto, se puede establecer que la decisión para escoger entre estas dos técnicas para el análisis de (±)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, galato de (-)-epicatequina y (-)-galato de epigallocatequina, depende fundamentalmente de la disponibilidad de muestra, tiempo y reactivos, ya que ambos equipos, HPLC y CE, poseen precios similares.

**Cuantificación de catequinas.** Se analizaron los extractos de las cinco muestras de tres variedades de cacao (ICS-39, TSH-565 e IMC-67) en cuanto a su contenido de catequinas, empleando las metodologías implementadas basadas en HPLC y EC. Los resultados se presentan en la Tabla 2. Las catequinas (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, no se hallaron en ninguno de los extractos por encima de los niveles mínimos de detección. Las catequinas ( $\pm$ )-C y (-)-EC se detectaron y cuantificaron en los cinco extractos. Mientras que las diferencias en la cuantificación de ( $\pm$ )-C por CE y por HPLC no fueron significativas, los resultados de la cuantificación de (-)-EC presentaron diferencias relativas entre 2,7 y 13,9%, siendo en todos los 5 casos el valor obtenido por CE inferior al resultado de HPLC. En la Figura 5 se observan un cromatograma y un electroforegrama representativo del extracto de la variedad TSH-565 de cacao estudiada.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a COLCIENCIAS por su apoyo financiero a través del centro de Excelencia CENIVAM (Contrato RC-432-2004) y al Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander.

### Referencias

- Auger, C.; Al-Awwadi, N.; Bornet, A.; Rouanet, J.; Gase, F.; Cros G.; Teissedre P. 2004. Catechins and procyanidins in mediterranean diets. *Food Res Inter* **37**:233-245.
- Bowser, M.; Frost, N.; Jing, M. 2010. Capillary electrophoresis. *Anal Chem* **82**:4682-4698.
- Castro, M.; López, J.; Gonzáles, M.; Barral, L. 2011. Development, validation and application of micellar capillary chromatography method for routine analysis of catechins, quercetin and thymol in natural samples. *Microchem J* **99**:461-469.
- Calderón, A.; Wright, B.; Hurts, J.; Breemen, R. 2009. Screening antioxidants using LC-MS: Case study with cocoa. *J Agric Food Chem* **57**:5693-5699.
- Dalluge, J.; Nelson, B. 2000. Determination of tea catechins. *J Chromatogr A* **880**:411-424.
- Folch-Cano, C.; Jullian, C.; Speisky, H.; Olea-Azar, C. 2010. Antioxidant activity of inclusion complexes of tea catechins with  $\alpha$ -cyclodextrins by ORAC assays. *Food Res Int* **43**:2039-2044.
- Her, M.; Koel, M. 2003. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* **990**:225-230.
- Kartsova L.; Ganzha O. 2006. Electrophoretic separation of tea flavanoids in the modes of capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography. *Russ J Appl Chem* **79**:1110-1114.
- Niemenak, N.; Rohsius, C.; Elwers, S.; Ndoumou D. O.; Lieberei R. 2006. Comparative study of different cocoa (Theobroma cacao L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *J Food Composition Anal* **19**:612-619.
- Nishitani, E.; Sagesaka Y. 2004. Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolics compounds in tea using new HPLC method. *J Food Comp Anal* **17**:675-685.
- Putte, L. B.; Hollman, P. 2000. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk. *J Agric Food Chem* **48**:1752-1757.
- Rice-Evans, C. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* **20**(7):933-956.
- Tsao, R.; Deng, Z. 2004. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J Chromatogr B* **812**:85-99.
- Valls, J.; Millán, S.; Martí, M.; Borràs, E.; Arola, L. 2009. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones, and flavonols. *J Chromatogr A* **1216**(43):7143-7172.
- Vanhoenacker, G.; Villiers, A.; Lazou, K.; De Keukeleire D.; Sandra P. 2001. Comparison of high-performance liquid chromatography-mass spectroscopy and capillary electrophoresis-mass spectroscopy for the analysis of phenolic compounds in diethyl ether extracts of red wines. *J Chromatogr A* **54**:309-315.
- Yilmaz, Y. 2006. Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Sci & Tech* **17**:64-71.

Recibido: agosto 5 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.



# OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE JENGIBRE (*ZINGIBER OFFICINALE*) EMPLEANDO CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO

Armando Reyes-Najar<sup>1</sup>, Henry I. Castro-Vargas<sup>1</sup>, Luis I. Rodríguez-Varela<sup>2</sup>,  
Clara E. Quijano-Celis<sup>3</sup>, Fabián Parada-Alfonso<sup>\*1</sup>

## Resumen

Reyes-Najar A., Castro-Vargas H. I., Rodríguez-Varela L. I., Quijano-Celis C.E., Parada-Alfonso F.: Obtención de extractos de jengibre (*Zingiber officinale*) empleando CO<sub>2</sub> supercrítico. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 35 (136): 381-385, 2011. ISSN 0370-3908.

Mediante extracción con fluidos supercríticos-EFS se obtuvieron extractos de rizomas de jengibre (*Zingiber officinale*), con CO<sub>2</sub> a diferentes condiciones de presión y temperatura. Adicionalmente, mediante extracción soxhlet se obtuvieron extractos lipofílicos. Los rendimientos de extracción fueron determinados y los extractos obtenidos se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). La EFS permitió obtener extractos libres de solvente, alcanzando un rendimiento de 1.51% a 17.9 MPa y 40 °C. Por CG-EM se lograron identificar más de treinta componentes presentes en los extractos, algunos de los cuales le imparten el aroma característico al jengibre y poseen importantes tipos de actividad biológica.

**Palabras clave:** extracción con fluidos supercríticos, CO<sub>2</sub> supercrítico, *Zingiber officinale*, jengibre.

## Abstract

Extracts from ginger rhizomes (*Zingiber officinale*) were obtained by supercritical fluid extraction-SFE, with CO<sub>2</sub> at different conditions of temperature and pressure. Additionally, lipophilic extracts were obtained by soxhlet extraction. The extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and there were determined the respective extraction yields. With SFE was possible to obtain solvent free extracts, they were enriched with aroma impact compounds and with important biological activity compounds, reaching an extract yield of 1.51% to 17.9 MPa and 40 °C. Over thirty components present in the extracts were identified by GC-MS.

**Key words:** Supercritical fluid extraction, supercritical CO<sub>2</sub>, *Zingiber officinale*, ginger.

<sup>1</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490. Bogotá-Colombia.

<sup>2</sup> Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá-Colombia.

<sup>3</sup> Departamento de Química, Universidad de los Andes, Bogotá-Colombia.

\* Autor que recibirá la correspondencia. Tel.: 3165000 Ext. 14448. Fax: 3165220. Correo electrónico: fparadaa@unal.edu.co

## Introducción

La creciente demanda mundial por productos naturales en fresco o procesados, o por productos terminados que contengan componentes naturales, es una oportunidad para nuestro país, dadas las ventajas comparativas que éste posee. En esa dirección, el procesamiento de especies y plantas aromáticas puede constituir una posibilidad para aumentar el nivel de exportaciones no tradicionales, dada la demanda mundial que existe por productos vegetales del trópico, por sus delicadas y exóticas características sensoriales. Dicha posibilidad se acentúa al aumentar el conocimiento sobre nuestros recursos naturales, tal cual ha ocurrido con algunas frutas tropicales (**Duque & Morales, 2005**).

El jengibre (*Zingiber officinale*) es una planta nativa de Asia, cultivada en numerosas partes del mundo incluyendo el oeste de la India, Jamaica y África. Esta planta ha sido introducida a Colombia, actualmente existen algunos cultivos tecnificados y es una de las plantas medicinales comercializadas y avaladas por la OMS (**Duque, 2000**). Debido a que el aceite esencial que se obtiene del rizoma es un producto con un alto valor agregado, continuamente se buscan nuevas y mejores técnicas de extracción que conduzcan a mejorar la calidad y los rendimientos en la obtención de dicho aceite.

El aceite esencial y la oleorresina obtenidas del jengibre son de gran interés para el sector alimenticio y la medicina, debido a diferentes propiedades asociadas a su consumo tales como capacidad antioxidante (**Stoilova et al., 2007**; **Taghizadeh et al., 2007**), anticáncer (**Shukla & Singh, 2007**), antiespasmódico y antidiarreico (**World Health Organization, 1999**), entre otras. Estas características son debidas a algunas sustancias químicas presentes en dicho material vegetal, tales como los gingeroles. Adicionalmente, el aceite esencial de jengibre se compone de otros grupos de sustancias como monoterpenos y sesquiterpenos, responsables de las correspondientes características sensoriales (**Gong et al., 2004**). El aceite esencial de jengibre es obtenido tradicionalmente por destilación con arrastre de vapor o extracción soxhlet (**Vásquez et al., 2001**). Estos procesos no son costosos pero pueden inducir transformaciones de algunos componentes del aceite (degradación térmica y oxidativa); por otra parte, los extractos obtenidos con solventes orgánicos contienen residuos que contaminan los alimentos y las fragancias en los que se empleen.

A diferencia de las técnicas tradicionales, la extracción con fluidos supercríticos (EFS) permite obtener extractos libres de solventes, manteniendo las propiedades

organolépticas del material vegetal de partida, sin ocasionar contaminación sobre el medio ambiente (**Herrero et al., 2010**). Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo planteado en esta investigación fue obtener extractos de jengibre libres de solvente, empleando un equipo de EFS diseñado y construido en nuestro grupo de investigación, el cual permite utilizar dióxido de carbono supercrítico (CO<sub>2</sub> SC) como solvente, y comparar los extractos obtenidos por EFS con los correspondientes obtenidos mediante extracción tradicional con solventes (soxhlet).

## Materiales y métodos

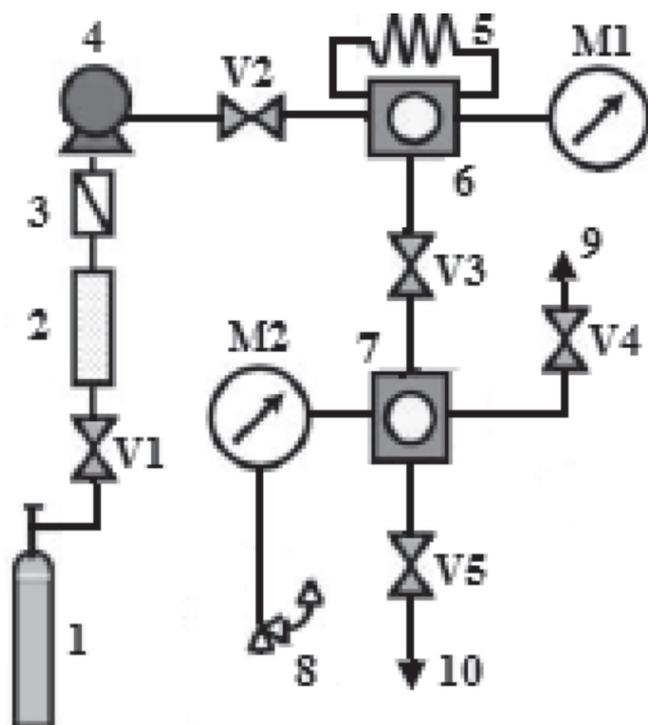
### Materiales y muestra

Los rizomas de jengibre fueron adquiridos en un mercado local. Las muestras fueron cortadas y secadas a 30 °C. El CO<sub>2</sub> (99.9% de pureza) fue proporcionado por INGEGAS-Bogotá. Se emplearon solventes orgánicos grado analítico, los cuales fueron previamente destilados.

### Obtención de extractos

*Extracción soxhlet:* Dos muestras vegetales (10.0 g) puestas en dedales de papel, fueron sometidas a extracción soxhlet durante 1.0 h, por separado, empleando n-hexano (Sox<sub>1</sub>) y éter etílico (Sox<sub>2</sub>), respectivamente. Una vez obtenidos los extractos, éstos fueron secados, concentrados, pesados y refrigerados hasta su análisis.

*Extracción con fluidos supercríticos:* La EFS a partir del rizoma de jengibre fue realizada utilizando el sistema de extracción presentado en la figura 1. Dicho sistema fue construido por nuestro grupo de investigación, empleando en su totalidad acero inoxidable 316 y permite realizar extracción por lotes en modalidad estática (**Nivia et al., 2007**). El equipo mencionado está conformado por (1) cilindro de CO<sub>2</sub>, (2) trampa de humedad, (3) filtro, (4) bomba neumática (HASKEL® modelo AGT-7/30, CA. USA), (5) regulador de temperatura (WATLOW serie SD 31, MI, USA, ± 1.0 °C) con termocupla tipo K, (6) celda de extracción de 50.0 mL, (7) separador de 40.0 mL, (8) válvula de seguridad, (9) salida del CO<sub>2</sub>, (10) recolección del extracto, (V1-V5) válvulas de aguja (WHITEY series SS-1VS4 y SS-1VR4, OH, USA) y (M1-M2) manómetros (BOURDON HAENNI, Vendôme cedex, France, 70 MPa). El procedimiento de extracción consistió en ubicar la muestra (10.0 g por cada ensayo) en la celda de extracción y ponerla en contacto, durante 1.0 h en modo estático, con el CO<sub>2</sub> SC a las condiciones de extracción (EFS<sub>1</sub> 40 °C/13.8 MPa; EFS<sub>2</sub> 40 °C/17.9 MPa; EFS<sub>3</sub> 40 °C/20.7 MPa; EFS<sub>4</sub> 50 °C/13.8 MPa; EFS<sub>5</sub> 50 °C/17.9 MPa; EFS<sub>6</sub> 50



**Figura 1.** Sistema de extracción con fluidos supercríticos-EFS. (1) CO<sub>2</sub>, (2) trampa de humedad, (3) filtro, (4) bomba neumática, (5) regulador de temperatura, (6) extractor, (7) separador, (8) válvula de seguridad, (9) salida del CO<sub>2</sub>, (10) recolección del extracto, (V1-V5) válvulas y (M1-M2) manómetros.

°C/20.7 MPa). Pasado el tiempo de extracción se abrió V3, permitiendo la despresurización de la celda de extracción y posterior recolección del extracto por apertura de V5. Finalmente los extractos fueron pesados y refrigerados hasta su análisis.

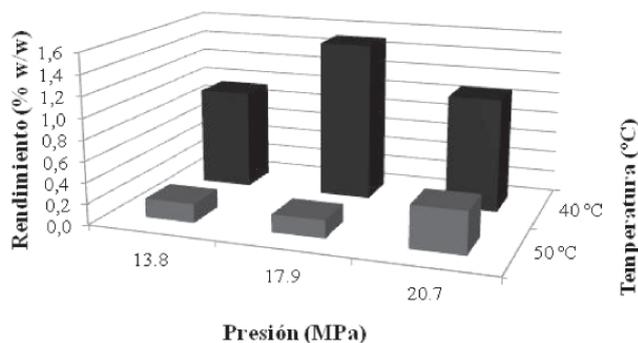
#### Análisis de los extractos por CG-EM.

El análisis de los extractos obtenidos se realizó en un cromatógrafo de gases HP 6890 GC-System, equipado con una columna HP-5 (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm). Se usó un programa de temperatura de 50 °C por 4 minutos, y una rampa de 2 °C/min hasta alcanzar 280 °C. La temperatura en el inyector y en la línea de transferencia hacia el detector fue de 230 °C. Se empleó helio como gas portador, a una velocidad de 1.7 mL/min. Las muestras fueron inyectadas en modo split-less. La energía de ionización fue 70 eV (Martínez et al., 2007). Los compuestos fueron identificados de acuerdo al criterio cromatográfico (índices de Kovats, I.K., consultados en el sitio web del National Institute of Standards and Technology, NIST) y al criterio espectral (espectros de masas).

#### Resultados

Los extractos de jengibre obtenidos por soxhlet mostraron rendimientos de 1.58 y 2.79% (empleando n-hexano y éter etílico, respectivamente); de acuerdo al análisis por CG-EM de dichos extractos, éstos presentaron residuos de los solventes empleados, lo cual les confirió a cada uno el aroma del solvente respectivo. La mayoría de compuestos identificados en dichos extractos fueron terpenos, lo cual coincide con los reportes encontrados en literatura (Martínez et al., 2007). En el extracto Sox<sub>1</sub> se detectó un total de 37 compuestos, de los que se identificaron 22 (52%, porcentaje relativo por normalización de áreas), siendo los mayoritarios decanal, β-burboneno y linoleato de etilo; por otra parte, se logró detectar 41 constituyentes en el extracto Sox<sub>2</sub>, de los que se identificaron 25 (78%), determinando como mayoritarios al α-zingibereno, β-sesquifelandreno, citral y α-farneseno (tabla 1).

Respecto a los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> SC, en la figura 2 se presenta el rendimiento en extracto obtenido bajo las diferentes condiciones de extracción. Es importante señalar que la totalidad de dichos extractos estuvieron exentos de solventes y presentaron un aroma intenso y característico. Con relación al efecto de la temperatura sobre el rendimiento de extracción, se observó que el incremento de ésta generó una disminución en la cantidad de extracto obtenido; a 40 °C se obtuvieron los mejores rendimientos (1.51% a 17.9 MPa; 1.08% a 20.7 MPa; 0.95% a 13.8 MPa), los que contrastaron con los obtenidos a 50 °C (0.40% a 20.7 MPa; 0.18% a 13.8 MPa; 0.17% a 17.9 MPa), lo cual puede deberse a la disminución en la densidad del CO<sub>2</sub> SC al aumentar la temperatura. Respecto a la influencia de la presión, no se observó un comportamiento claro (mientras que a 40 °C se observó un máximo a 17.9 MPa, a 50 °C se presentó un mayor rendimiento a 20.7 MPa).



**Figura 2.** Rendimientos obtenidos en las extracciones con CO<sub>2</sub> SC.

**Tabla 1.** Composición de extractos de jengibre obtenidos por soxhlet y por EF

COMPUESTO	I.K. (ref) <sup>a</sup>	I.K. (exp) <sup>b</sup>	% Relativo por normalización de áreas							
			Sox <sub>1</sub>	Sox <sub>2</sub>	EFS <sub>1</sub>	EFS <sub>2</sub>	EFS <sub>3</sub>	EFS <sub>4</sub>	EFS <sub>5</sub>	EFS <sub>6</sub>
Octanal	1002	996	0,5	0,2	2,1	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2
Limoneno	1022	1018	1,7	1,7	0,4	3,9	0,9	5,2	0,1	0,8
Linalol	1085	1087	0,2	0,6	0,2	1,5	Nd	0,2	0,1	0,3
Citronelal	1153	1151	0,9	1,6	1,3	1,4	0,8	0,3	5,1	0,3
Borneol	1165	1159	0,6	0,1	0,5	0,8	0,3	0,2	1,4	0,8
$\alpha$ -Terpineol	1177	1176	2,2	1,5	1,0	0,6	0,7	0,4	9,5	0,3
Decanal	1199	1191	9,9	4,1	4,1	0,3	3,9	0,1	0,6	0,1
$\beta$ -Citronelol	1218	1219	2,9	0,4	2,1	Nd	1,4	0,2	0,1	0,1
Nerol	1227	1230	2,8	5,1	2,0	10,3	1,5	0,3	0,5	0,2
Citral	1271	1266	3,9	7,9	2,8	12,6	2,6	0,8	0,2	0,1
$\alpha$ -Cubebeno	1364	1360	1,6	0,5	1,1	1,5	0,7	0,2	0,2	0,6
$\beta$ -Burboneno	1384	1378	9,6	1,3	2,6	3,3	1,6	0,2	1,2	0,4
$\gamma$ -Elemeno	1418	1417	0,1	1,2	1,2	0,4	1,0	0,2	Nd	Nd
$\alpha$ -Zingibereno	1494	1492	1,3	17,5	3,8	2,4	Nd	2,9	0,1	1,9
$\alpha$ -Farneseno	1505	1505	Nd	6,3	Nd	Nd	11,2	Nd	Nd	Nd
$\beta$ -Sesquifelandreno	1526	1525	Nd	13,2	Nd	Nd	17,9	Nd	Nd	Nd
<i>trans</i> -Nerolidol	1537	1535	Nd	1,4	22,6	Nd	1,0	Nd	Nd	Nd
Hediculariol	1534	1542	Nd	Nd	1,1	Nd	3,1	Nd	Nd	Nd
Trujopseno	1550	1554	2,6	Nd	0,9	Nd	3,0	Nd	Nd	Nd
Ladol	1566	1564	0,7	0,5	1,7	4,2	Nd	Nd	Nd	Nd
Oxido de cariofileno	1580	1580	1,2	3,1	2,8	0,7	2,3	0,1	1,3	0,3
Oxido de humuleno	1604	1603	2,5	Nd	5,4	7,9	4,2	0,1	5,3	2,3
$\tau$ -Cadinol	1630	1632	0,4	0,2	Nd	7,8	Nd	0,9	0,6	1,2
Zingerona	1653	1654	Nd	Nd	0,1	1,3	Nd	Nd	14,6	8,3
$\alpha$ -Bisabolol	1686	1686	Nd	Nd	0,4	Nd	0,1	Nd	0,6	0,3
Farnesol	1740	1734	0,9	2,3	1,8	Nd	1,9	0,1	0,2	0,3
Longipinocarveol	Nrep	1746	Nd	Nd	Nd	3,3	Nd	1,2	2,1	3,3
Alloaromadendreno	Nrep	1852	Nd	2,0	Nd	0,5	Nd	0,9	Nd	Nd
Heneicosano	2100	2119	Nd	Nd	1,0	1,4	1,0	<0,1	2,2	Nd
Linoleato de etilo	2151	2136	6,3	Nd	0,3	Nd	Nd	5,3	6,0	1,9
Docosano	2200	2210	Nd	0,5	1,2	Nd	1,5	4,4	0,1	14,8
Gingerol	Nrep	2288	Nd	Nd	0,7	1,5	1,2	<0,1	0,3	3,1
Tetraecosano	2400	2395	Nd	2,5	1,5	3,0	Nd	Nd	Nd	Nd
Hexaeicosano	2600	2590	0,5	0,1	1,5	0,8	1,3	2,5	3,8	0,5
<b>Id. (%)</b>			<b>52</b>	<b>78</b>	<b>69</b>	<b>78</b>	<b>66</b>	<b>36</b>	<b>43</b>	<b>39</b>
<b>TOTAL</b>			<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

<sup>(a)</sup> I.K. de literatura. <sup>(b)</sup> I.K. experimental. **Nrep**: No reportado, **Nd**: No detectado, **Id.**: Identificados.

En los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> SC se lograron identificar 34 compuestos (tabla 1), principalmente aldehídos y alcoholes terpénicos, tales como: citronelal, citral, linalol, borneol,  $\alpha$ -terpineol, nerol, ladol,  $\alpha$ -bisabolol y longipinocarveol. Los componentes mayoritarios en cada uno de los extractos obtenidos fueron: en el extracto EFS<sub>1</sub> el *trans*-nerolidol, en EFS<sub>2</sub> citral y nerol, en EFS<sub>3</sub>  $\beta$ -sesquifelandreno y  $\alpha$ -farneseno, en EFS<sub>4</sub> linoleato de etilo y limoneno, en

EFS<sub>5</sub> zingerona y  $\alpha$ -terpineol y en EFS<sub>6</sub> docosano y zingerona. Contrasta la ausencia de  $\alpha$ -farneseno,  $\beta$ -sesquifelandreno, *trans*-nerolidol, hediculariol, trujopseno y ladol en los extractos obtenidos a 50 °C, con la presencia de cantidades importantes de  $\alpha$ -zingibereno en EFS<sub>4</sub>, de óxido de humuleno y zingerona en EFS<sub>5</sub> y EFS<sub>6</sub>, así como de gingerol en EFS<sub>6</sub>. Tanto la zingerona como el gingerol, compuestos típicos del aceite esencial y la oleorresina de

jengibre, son ampliamente reconocidos por sus propiedades antioxidantes (Stoilova *et al.*, 2007; Burdock, 1995; Pfeiffer *et al.*, 2006).

### Discusión

En general, la composición de los extractos obtenidos en este trabajo empleando CO<sub>2</sub> SC es relativamente similar, sin embargo existen diferencias considerables respecto a la concentración relativa de cada uno de los compuestos identificados, algo que también se evidencia al comparar dichos extractos con los obtenidos por soxhlet. Respecto a algunos de los compuestos señalados anteriormente, vale la pena resaltar que el  $\alpha$ -zingibereno,  $\alpha$ -farneseno,  $\beta$ -sesquifelandreno, linalol, borneol y nerol son compuestos asociados al aroma del rizoma de jengibre; adicionalmente, debido a su importancia medicinal y alimenticia es importante destacar la presencia de  $\alpha$ -zingibereno,  $\alpha$ -farneseno y  $\beta$ -sesquifelandreno en algunos extractos (Stoilova *et al.*, 2007; Bhupesh *et al.*, 1996). Por otra parte, la zingerona y el gingerol, se asocian al sabor pungente y picante de jengibre (Shukla & Singh, 2007; Bhupesh *et al.*, 1996).

### Conclusiones

De las técnicas evaluadas en la obtención de aceite esencial a partir de rizoma de jengibre (*Z. officinale*), se evidenció que la EFS, empleando como solvente CO<sub>2</sub> SC, presentó los mejores resultados respecto a cantidad y composición de los extractos obtenidos; adicionalmente ésta es una metodología selectiva y amigable con el ambiente que permitió la obtención de extractos libres de solventes. De los parámetros evaluados en las EFS las condiciones experimentales asociadas al mayor rendimiento fueron 40 °C y 17.9 MPa (EFS<sub>2</sub>), con un 1.51% en extracto. Sin embargo, los extractos EFS<sub>5</sub> y EFS<sub>6</sub> resultaron muy interesantes por contener cantidades importantes de compuestos con actividad antioxidante y sabor pungente (característico del jengibre), tales como la zingerona y el gingerol.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Colombia, por la financiación del presente estudio.

### Referencias

- Bhupesh R, Motonobu G, Tsutomu H. 1996. Extraction of Ginger oil with supercritical carbon dioxide: experiments and modelling. *Ind. Eng. Chem. Res.* 35:607-612.
- Burdock G. 1995. *Fenaroli's Handbook Of Flavor Ingredients*, CRC PRESS. Florida, USA.
- Duque A. 2000. Encuesta Nacional de Plantas Medicinales y Aromáticas una Aproximación al Mercado de las PMYA en Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Duque C, Morales AL. 2005. *El Aroma Frutal de Colombia*. Editorial Unibiblos, Bogotá, Colombia.
- Gong F, Fung Y, Liang Y. 2004. Determination of volatile components in Ginger using gas chromatography-mass spectrometry with resolution improved by data processing techniques. *J. Agric. Food Chem.* 52:6378-6383.
- Herrero M, Mendiola JA, Cifuentes A, Ibañez E. 2010. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications-Review. *J. Chromatogr. A* 1217:2495-2511.
- Martínez J, Monteiro R, Rosa P, Marques M, Meireles A. 2003. Multicomponent model to describe extraction of Ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42:1057-1063.
- Nivia A, Castro H, Parada F, Rodríguez I, Restrepo P. 2007. Aprovechamiento integral de la guayaba (*Psidium guajava* L.): I. Obtención de extractos a partir de semillas utilizando como solvente CO<sub>2</sub> supercrítico. *Sci. Tech.* 33:120-123.
- Pfeiffer E, Heuschmid F, Kranz S, Metzler M. 2006. Microsomal hydroxylation and glucuronidation of [6]-gingerol. *J. Agric. Food Chem.* 54:8769-8774.
- Shukla Y, Singh M. 2007. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. *Food Chem. Toxicol.* 45:683-690.
- Stoilova I, Krastanov A, Stoyanova A, Denev P, Gargova, S. 2007. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chem.* 102:764-770.
- Taghizadeh A, Shirpoora A, Farshid A, Saadatian R, Rasmi Y, Saboory E, Ilkhanizadeh B, Allameh A. 2007. The effect of ginger on diabetic nephropathy, plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation in rats. *Food Chem.* 101:148-153.
- Vásquez O, Alba A, Marreros J. 2001. Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). *Rev. Amaz. Inv. Alim.* 1:38-42.
- World Health Organization. 1999. *Monographs on Selected Medicinal Plants*. World Health Organization. Geneva, Switzerland.

Recibido: julio 27 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.



# CARBONES ACTIVADOS A PARTIR DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR Y ZURO DE MAÍZ PARA LA ADSORCIÓN DE CADMIO Y PLOMO

Oliva Primera-Pedrozo, Fredy Colpas-Castillo<sup>1</sup>, Edgardo Meza-Fuentes<sup>2</sup>, Roberto Fernández-Maestre<sup>3</sup>

## Resumen

**Primera-Pedrozo, O., F. Colpas-Castillo, E. Meza-Fuentes, R. Fernández-Maestre:** Carbones activados a partir de bagazo de caña de azúcar y zuro de maíz para la adsorción de cadmio y plomo. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **35** (136): 387-396, 2011. ISSN 0370-3908.

Se prepararon carbones activados con bagazo de caña de azúcar (BC) y zuro de maíz (ZM) para adsorber cadmio y plomo. BC y ZM fueron carbonizados a 400°C por 1 hora, activados con ácido fosfórico y modificados con ácido nítrico o peróxido de hidrógeno y posterior calentamiento. La activación aumentó el área superficial de los carbones (5 m<sup>2</sup>/g a 778 m<sup>2</sup>/g para el ZM y 3 m<sup>2</sup>/g a 369 m<sup>2</sup>/g para BC). Los grupos oxigenados se analizaron por IR-DRIFTS. La acidez de los carbones estuvo entre 1.36 y 2.12 meq/g, el pH entre 2.9 y 6.5, y las capacidades de intercambio iónico hasta 0.070 meq/g (adsorción atómica).

**Palabras clave:** bagazo de caña, zuro de maíz, cadmio, plomo, carbón activado, carbonizado.

## Abstract

Activated carbons were prepared with sugar cane bagasse (BC) and corn cob (ZM) to adsorb aqueous cadmium and lead. BC and ZM were carbonized at 400°C for 1 hour, activated with phosphoric acid and modified with nitric acid or hydrogen peroxide and subsequent heating. Activation increased the surface area of carbons (5 m<sup>2</sup>/g to 778 m<sup>2</sup>/g for ZM and 3 m<sup>2</sup>/g to 369 m<sup>2</sup>/g for BC). Oxygenated groups were analyzed by IR-DRIFTS. The acidity of carbons was between 1.36 and 2.12 meq/g, pH between 2.9 and 6.5, and ion exchange capacities up to 0.070 meq/g (atomic absorption).

**Key words:** sugar cane bagasse, corn cob, cadmium, lead, activated carbons, carbonized.

---

Programa de Química, Universidad de Cartagena, Colombia.

1 Grupo de carboquímica.

2 Grupo de estudios en materiales y combustibles.

3 Grupo de Medio Ambiente y Química Aplicada.

1 Autor correspondiente: rfernandezm@unicartagena.edu.co. Campus de Zaragocilla, Programa de Química, Cartagena, Colombia.

## Introducción

El carbón en sus diferentes formas juega un papel importante en muchas industrias. La mayoría de carbones industriales son producidos a partir de materiales carbonosos naturales como huesos de frutas, lignitos, carbón de hulla, turba, etc., a los cuales se les aplica un tratamiento térmico en ausencia de aire a temperaturas inferiores a 900°C. El nombre “Carbones Activados” es usado para denominar los materiales carbonosos que han sido tratados con un agente químico o físico activante; la activación química aumenta la porosidad y forma diferentes grupos funcionales sobre la superficie del carbón (Marsh *et al.* 1997).

**Activación química.** La materia carbonácea se impregna con una disolución concentrada de agentes químicos y se carboniza entre 350 y 900°C en atmósfera inerte (Rodríguez-Reinoso & Molina-Sabio, *et al.* 1998). Los agentes de activación química más utilizados son el cloruro de zinc, el ácido fosfórico y el hidróxido de potasio. El cloruro de zinc ha sido desplazado por el ácido fosfórico por problemas de corrosión, bajos rendimientos y presencia de zinc residual en el producto final. Los carbones activados obtenidos con estos agentes son generalmente mesoporosos, de baja densidad y poca resistencia a la abrasión. Estas características los hacen aplicables para fase líquida pero no para fase gaseosa. Otros materiales para activar carbones son: hidróxido de sodio (Hao & Wang, 2010), sulfato, hipoclorito y fosfato de sodio, fosfato y cloruro de calcio (Rajakovic & Ristic, 1996) e hidróxido de calcio, cloruro y sulfato manganeso, ácidos bórico, nítrico (ShamsiJazeyi & Kaghazchi, 2010), sulfúrico y fosfórico (Rosas *et al.* 2009), cloruros férrico (Cui & Turn, 2009) y de zinc (Li *et al.* 2010), sulfuro, tiocianato y carbonato de potasio, azufre, dióxido de manganeso, dolomita, cianuros, peróxido de hidrógeno (Gan & Wu, 2008), etanotiol (Kim *et al.* 2011), 8-Hidroxiquinolina (Garoma *et al.* 2010), ácidos cítrico y tartárico, cloruro de bario (Rajakovic & Ristic, 1996), y gases como ozono (He *et al.* 2008), dióxido de carbono (Singh & Lal, 2010), dióxido de azufre y sulfuro de hidrógeno (Macias-García *et al.* 2003), cloro (Kim *et al.* 2011), etc.

**Materia prima.** Los carbones industriales son producidos en su mayoría a partir de materiales carbonosos naturales como carbón y material de desecho vegetal como madera, semillas y podas. Los materiales de partida para obtener carbón activado también pueden ser: algas, cáscara de arroz, lignina, aserrín, cáscara de semilla de algodón, lignito, lodos ácidos de petróleo, madera, carbón mineral, huesos de frutas, melaza, carbón vegetal, desper-

dicios de pasta de papel, negro de humo, residuos de carne y sangre, olotes, huesos, desechos de destilería, pescado, cereales, cuesco de palma africana, turba, carbohidratos, coque de petróleo, granos de café, hollín, cáscara de nueces, grafito (Arpa *et al.* 2000; Burns *et al.* 1999), cáscara de coco (Song *et al.* 2010), cáscara de frutas (Tongpoothorn *et al.* 2011), palma de aceite (Navarrete *et al.* 2005), y residuo de tabaco (Kilic *et al.* 2011). Estas materias primas deben tener alto contenido de carbono y bajo contenido de material mineral, y ser de fácil activación, alto rendimiento, baja degradación durante su almacenamiento y bajo costo.

**Estructura de los carbones activados.** Los carbones activados tienen una estructura porosa con pequeñas cantidades de heteroátomos, principalmente oxígeno y pueden contener hasta 20% en peso de materia mineral, expresado como contenido de cenizas; la naturaleza de las cenizas depende del material de partida del carbón activado; normalmente un carbón activado está compuesto de placas de 2-5 nm de altura constituidas por unidades de 5 a 15 anillos aromáticos condensados, semejantes a la estructura de un grafito (Marsh *et al.* 1997; López-Ramón *et al.* 1999). El carbón activado adsorbe una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos de fases líquidas o gaseosas. Estos poros pueden dividirse en macroporos (diámetro mayor de 500 Å), mesoporos (entre 500 y 20 Å) y microporos (menor de 20 Å) (Juntgen, 1986; Castilla *et al.* 2000). La distribución del tamaño del poro se obtiene utilizando isotermas de adsorción, principalmente por el método BET (Haenel, 1982). El área superficial, la distribución, volumen y tamaño de poro, la superficie química, la distribución y densidad de la partícula, la resistencia al calor, la dureza, el contenido de cenizas y otros parámetros que caracterizan al carbón activado dependen de la materia prima y de las condiciones de carbonización y activación (Marsh *et al.* 1997). La superficie química juega un papel importante ya que los heteroátomos y los grupos funcionales oxigenados de la superficie pueden actuar como sitios activos.

La química de superficie de los materiales carbonosos esta básicamente determinada por el carácter básico o ácido de su superficie. Los tratamientos con agentes oxidantes fijan en su superficie complejos oxigenados tales como carboxilos, lactonas, fenoles, cetonas, quinonas, alcoholes y éteres, adecuados para la complejación de metales (López-Ramón *et al.* 1999; Castilla *et al.* 2000). Los carbones activados han sido aplicados a la adsorción de contaminantes como gases e iones metálicos de plomo (Li *et al.* 2010; Song *et al.* 2010), cadmio (Kim *et al.* 2011; Garoma *et al.* 2010), y otros metales pesados.

En este trabajo se prepararon carbones activados para adsorber cadmio y plomo con bagazo de caña de azúcar (BC) y zuro de maíz (ZM) mediante carbonización a 400°C, activación con ácido fosfórico y oxidación con ácido nítrico o peróxido de hidrógeno.

## Experimental

Los carbones preparados fueron codificados como ZM (provenientes del zuro de maíz) y BC (provenientes del bagazo de caña).

**Recolección y preparación de los materiales vegetales de partida.** El bagazo de caña de azúcar se recogió en el mercado de Bazurto, Cartagena, y el zuro de maíz en el corregimiento de Palo Alto (Sucre), en Colombia. El bagazo y el zuro fueron secados a 105°C por 24 horas y luego fueron triturados.

**Carbonización.** Quinientos gramos de los materiales vegetales se calentaron (usando el montaje de la figura 1) en fracciones de 100 g desde 30°C hasta 400°C (10°C/min) en atmósfera de nitrógeno (110 mL/min) y fueron mantenidos a estas condiciones por 60 minutos (Hsisheng & Hsu, 1998). El carbón obtenido se molió y se tamizó a un tamaño de partícula de 125 a 300 micrómetros. Estos carbones fueron codificados como ZM-C (provenientes del zuro de maíz) y BC-C (provenientes del bagazo de caña).

**Activación química de los carbones con ácido fosfórico.** Veinte gramos de cada material carbonizado se sometieron al siguiente tratamiento (Hsisheng & Hsu, 1998; Huidobro *et al.* 2000): Se impregnaron con ácido ortofosfórico al 21% p/v (agente activante) con agitación constante por 4.5 horas, se secaron a 105°C por 24 horas, se calentaron en atmósfera de nitrógeno (flujo de 110 mL/min) desde 30°C hasta 450 ± 5°C (10°C/min) y se mantuvieron a estas condiciones por 120 minutos. Estos carbones fueron codificados como ZM-A y BC-A. Estos carbones activados fueron modificados mediante tratamiento térmico a 600°C, y oxidaciones con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno tal como se describe a continuación.

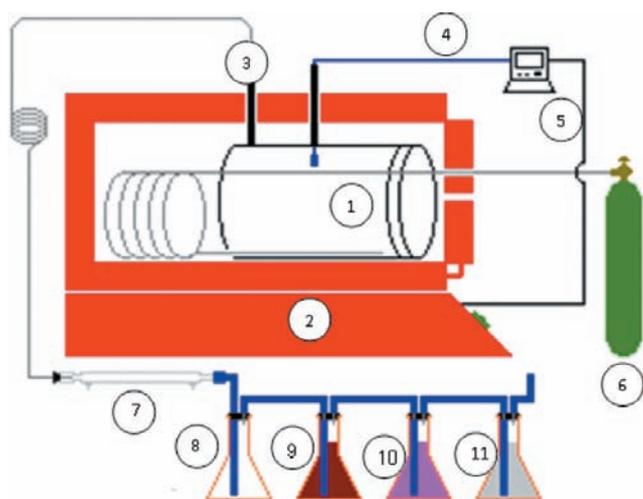
**Tratamiento térmico de los carbones activados.** Veinte gramos de los carbones activados ZM-A o BC-A se calentaron desde 30°C hasta 600°C (10°C/min) en atmósfera de nitrógeno (110 mL/min) y fueron mantenidas a estas condiciones por 60 minutos. Estos carbones activados fueron codificados como ZMΔ y BCΔ.

**Oxidación con ácido nítrico de los carbones activados.** Veinte gramos de los carbones activados ZM-A o BC-A se sometieron al siguiente tratamiento: Se agregaron 250 ml de HNO<sub>3</sub> al 15% y se digirieron por 30 minutos, se secaron a 105°C por 24 horas, se calentaron en atmósfera de nitrógeno (flujo de 110 mL/min) desde 30°C hasta 600 ± 5°C (10°C/min) y se mantuvieron a estas condiciones por 60 minutos. Estos carbones activados fueron codificados como ZM-HNO<sub>3</sub> y BC-HNO<sub>3</sub>.

**Oxidación con peróxido de hidrógeno de los carbones activados.** 20 g de los carbones activados ZM-A o BC-A se sometieron al siguiente tratamiento: se agregaron 250 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% y se digirieron por 30 minutos, se secaron a 105°C por 24 horas, se calentaron en atmósfera de nitrógeno (flujo de 110 mL/min) desde 30°C hasta 600 ± 5°C (10°C/min) y se mantuvieron a estas condiciones por 60 minutos. Estos carbones activados fueron codificados como ZM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y BC-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los materiales vegetales sometidos a carbonización, activación u oxidación se retiraron de la mufla cuando la temperatura era menor de 50°C, se lavaron alternativamente con agua caliente y fría hasta que la conductividad de las aguas de lavado fue muy similar a la conductividad del agua destilada usada para lavar, y se secaron a 105°C por 12 horas (Huidobro *et al.* 2000).

**Análisis Próximo.** La humedad se determinó por la pérdida de peso al calentar los carbones a 150°C por 3 horas en una estufa *Precision Scientific* Modelo 18 siguiendo la norma ASTM – D 3173-87. El porcentaje de materia volátil se determinó por la pérdida de peso cuando los carbones secados a 150°C fueron calentadas a 900 ± 5°C por 7 minutos en



**Figura 1.** Equipo de carbonización y activación. 1. Reactor de acero inoxidable. 2. Mufla. 3. Chimenea para vapores. 4. Termocupla tipo K. 5. Controlador de temperatura. 6. Cilindro de nitrógeno. 7. Condensador lineal. 8. Trampa de vapor. 9. Solución de NaOH 0.5N. 10. Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5N. 11. Agua.

atmósfera de nitrógeno en un horno *Ohio Thermal* siguiendo la norma ASTM – D 3175-99. El contenido de cenizas se calculó con el residuo después de quemar los carbones (previamente secados a 150°C por 3 horas) a  $650 \pm 5^\circ\text{C}$  en atmósfera de aire hasta peso constante en un horno *Ohio Thermal* siguiendo la norma ASTM – D 3174-97. El carbono fijo es aquel que queda después de calentar a  $650^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{N}_2$  y se calculó por diferencia, Carbono fijo (%) =  $100 - (\% \text{ materia volátil} + \% \text{ cenizas})$ .

**Análisis último.** El análisis último comprendió la determinación de carbono, hidrógeno azufre y nitrógeno, y el cálculo del oxígeno por diferencia y se realizó en un horno *Lindberg* siguiendo la norma ASTM – D 3178-89. La determinación de carbono e hidrógeno se realizó por pirólisis de los carbones en un sistema cerrado determinando los productos de la combustión, agua y dióxido de carbono, después de la oxidación completa. En este método, el carbono y el hidrógeno se determinaron por el incremento de peso de las trampas de  $\text{CO}_2$  y agua (Figura 1).

El nitrógeno se determinó en los laboratorios de Ingeominas, Cartagena. El nitrógeno de los carbones se convirtió en sales de amonio por digestión con ácido sulfúrico concentrado en una mezcla catalizada con sulfato de potasio a alta temperatura. Estas sales se disolvieron en una solución alcalina caliente de la cual el amonio se removió por destilación y se determinó por titulación ácido-base recogiéndolo en un recipiente con una cantidad medida de ácido clorhídrico. En la determinación de azufre total de los carbones se utilizó el método de la bomba lavadora (SCFI, 1982). En este método, los carbones se calcinan a  $800^\circ\text{C}$  por 90 minutos con una mezcla de óxido de magnesio y carbonato de sodio que precipita el azufre como  $\text{BaSO}_4$  a partir del cual se calcula el contenido de azufre. El porcentaje de oxígeno se calculó por diferencia.

**Análisis de grupos funcionales oxigenados por espectroscopia infrarroja de reflectancia difusa con transformada de Fourier (DRIFTS).** Los espectros DRIFTS fueron tomados de los carbones previamente secos ( $105^\circ\text{C}$  por 12 horas) en un espectrómetro Nicolet 510P FT-IR, promediando 150 barridos con una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$  en el rango de  $800 \text{ cm}^{-1}$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$ . Los carbones fueron pulverizados y tamizados utilizando mallas de 200. Estos espectros fueron tomados en el Laboratorio de Carbones de la Universidad Nacional de Colombia.

**pH de los carbones.** Se mezclaron 1.000 g de cada carbón con 20.00 mL de agua destilada libre de  $\text{CO}_2$  (Castilla *et al.* 2000) en recipientes de vidrio y se agitaron a temperatura ambiente por 24 horas; luego, se midió el pH de las suspensiones acuosas con un electrodo de vidrio (Orion 940).

**Caracterización textural de los carbones.** Se midieron la superficie específica (área total, área de microporos y área externa) utilizando la ecuación de BET, y la porosidad evaluada con el volumen de microporos (utilizando curvas *t*). Esta información se consiguió de las isothermas de adsorción de nitrógeno obtenidas en las siguientes condiciones: Desgasificado del carbón durante toda la noche a  $300^\circ\text{C}$ , peso de carbón 0.1000-0.2000 g, adsorbato nitrógeno, temperatura de adsorción 77K, rango de presión relativa 0.05-0.15 (para carbones activados), tiempo de equilibrio 25 s, velocidad de evacuación 300 mm Hg/min y tiempo de evacuación 1 min (Gregg & Sing, 1991). Estudios previos muestran que los carbones activados son esencialmente microporosos de acuerdo con la forma de las isothermas y que el modelo BET no cumple adecuadamente en el intervalo 0.05-0.35 de  $p/p_0$  (Gregg & Sing, 1991). Por tal razón se escoge una región al principio de la isoterma donde el modelo BET arroje correlaciones de 0.999 o mejores, que es equivalente al rango de presiones relativas de 0.05-0.15  $p/p_0$ .

**Medida del área superficial.** A cada una de los carbones activados se les determinó el área superficial específica por el método BET utilizando un equipo *Micromeritics Gemini 2375* usando como adsorbato nitrógeno a 77 K, entre 0.01 y 0.1  $p/p_0$ .

**Determinación de grupos oxigenados básicos y ácidos por el método de Boehm (Boehm, 1994).** Para los grupos oxigenados ácidos, se pesaron  $\sim 0.5000$  g de cada carbón y se agitaron a temperatura ambiente por 24 horas con 50.00 mL de una solución de NaOH 0.1000 N. Luego se filtró el carbón y la solución se tituló potenciométricamente con HCl 0.1000 N para determinar la cantidad de reactivo consumido. Para los grupos oxigenados básicos se repitió el procedimiento anterior pero se usó ácido clorhídrico 0.1000 N para la agitación y NaOH 0.1000 N para la titulación.

**Adsorción de plomo y cadmio.** En cada experimento se pesaron aproximadamente 0.2000 gramos de cada carbón y se les adicionaron 50.00 mL de las soluciones de Cd(II) y Pb(II) de 18.0 ppm y se agitaron a 120 rpm por 18 horas a temperatura ambiente. Luego se filtró la solución y los metales se determinaron por espectroscopia de absorción atómica con llama de acetileno-aire. Se prepararon curvas de calibración de patrones de 0.050, 0.100, 1.000, 2.000 y 5.000 ppm para Pb (283.3 nm) y de 0.100, 0.200, 0.500, 1.000 y 2.500 ppm para Cd (228.8 nm) con un coeficiente de correlación mínimo de 0.999; los patrones y las soluciones de intercambio se prepararon con estándares certificados de 1000.0 ppm (Sigma) de cada uno de los metales.

**Análisis estadístico.** Todos los cálculos estadísticos se realizaron con la ayuda de *statgraphics plus* versión

3.0. Se realizaron pruebas *anova* encontrar diferencias significativas entre las áreas superficiales y las capacidades de adsorción de plomo y cadmio de todos los carbones.

## Resultados y discusión

Se obtuvieron carbonizados y carbones activados a partir del zuro de maíz y bagazo de caña de azúcar con altas capacidades de adsorción de plomo y cadmio; algunos carbones removieron más del 99% de los metales en soluciones con una concentración de 15 ppm.

**Carbonización del zuro de maíz y bagazo de caña de azúcar.** Durante este proceso las unidades de celulosa, principal componente de los materiales vegetales de partida sufren depolimerización transformándose en unidades más pequeñas, se desprende materia volátil y se produce un sólido más rico en carbono (Rodríguez-Reinoso & Molina-Sabio, 1998). La Tabla 1 muestra los análisis próximo y último de los materiales vegetales de partida, carbonizados y carbones activados. El contenido de materia volátil y de carbono fijo para ambos materiales de partida es similar, arrojando rendimientos similares en la producción de carbones activados. El contenido de oxígeno y carbono en los materiales vegetales de partida también es muy similar lo que hace que los carbones producidos tengan propiedades parecidas. El proceso de carbonización aumentó significativamente el contenido de carbono de 47 a 74% y de 49 a 80% para BC y ZM respectivamente, disminuyó los porcentajes de nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y

materia volátil, y aumentó el carbono fijo y las cenizas para ambos carbones (Tabla 1).

**Activación de los carbonizados.** En los carbones activados, el contenido de carbono aumentó con una disminución proporcional de otros constituyentes químicos (Tabla 1). Este aumento del contenido de carbono se debe al carácter deshidratante del ácido fosfórico, que facilitó la pérdida de hidrógeno y oxígeno, y convirtió unidades carbonadas grandes en unidades más pequeñas con mayor riqueza en carbono (Rodríguez-Reinoso & Molina-Sabio, 1998). El ácido fosfórico aumenta la aromaticidad del carbón, la pérdida del carácter alifático y la formación de un sólido rígido entrecruzado (Hsisheng & Hsu, 1998; Huidobro *et al.* 2000). El bagazo de caña de azúcar y el zuro de maíz están compuestos básicamente por lignina, celulosa y hemicelulosa; con la carbonización a 400°C solo la celulosa y hemicelulosa se depolimerizaron en unidades más pequeñas para dar origen a una gran masa de carbono fijo ya que la lignina se descompone a temperaturas mayores de 200-500°C (Berkowitz, 1957; Kudo & Yoshida, 1957). Cuando se impregnó el carbonizado con ácido fosfórico se facilitó la hidrólisis de la lignina, que aún estaba presente en el carbonizado, de forma que aumentó el rendimiento del proceso y a la vez se desarrolló porosidad (Rodríguez-Reinoso & Molina-Sabio, 1998).

Después de la pérdida de agua, el ácido fosfórico se compone de una mezcla de ácidos polifosfóricos, incluyendo especies como  $H_3PO_4$ ,  $H_4P_2O_7$  y  $H_5P_3O_{10}$  y otras

Tabla 1. Análisis próximo y último de los materiales vegetales de partida, carbonizados y carbones activados.

Análisis Último (en base seca)					
Material	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	O <sup>a</sup> (%)
BC	47.1±0.1	6.9±0.1	0.77±0.00	0.09±0.00	45.1±0.1
BC-C	74.3±0.4	4.4±0.1	0.55±0.01	0.17±0.00	20.6±0.4
BC-A	74.0±0.2	3.6±0.1	0.57±0.08	0.00±0.00	21.8±0.2
ZM	49.5±0.4	6.7±0.1	0.83±0.00	0.04±0.01	42.9±0.2
ZM-C	80.0±0.7	4.5±0.1	0.72±0.06	0.01±0.00	14.8±0.6
ZM-A	82.9±0.4	3.1±0.1	0.80±0.06	0.00±0.00	13.2±0.4
Análisis Próximo (en base seca)					
Material	Humedad residual (%)	Materia volátil (%)	Cenizas (%)	Carbono fijo (%)	
BC	9.4±0.1	78±1	4.2±0.1	7.6±0.3	
BC-A	6.9±0.1	22.3±0.2	8.2±0.2	59±2	
ZM	11.6±0.1	78±1	3.8±0.1	7.1±0.4	
ZM-A	11.5±0.1	15.5±0.2	11.1±0.2	61±2	

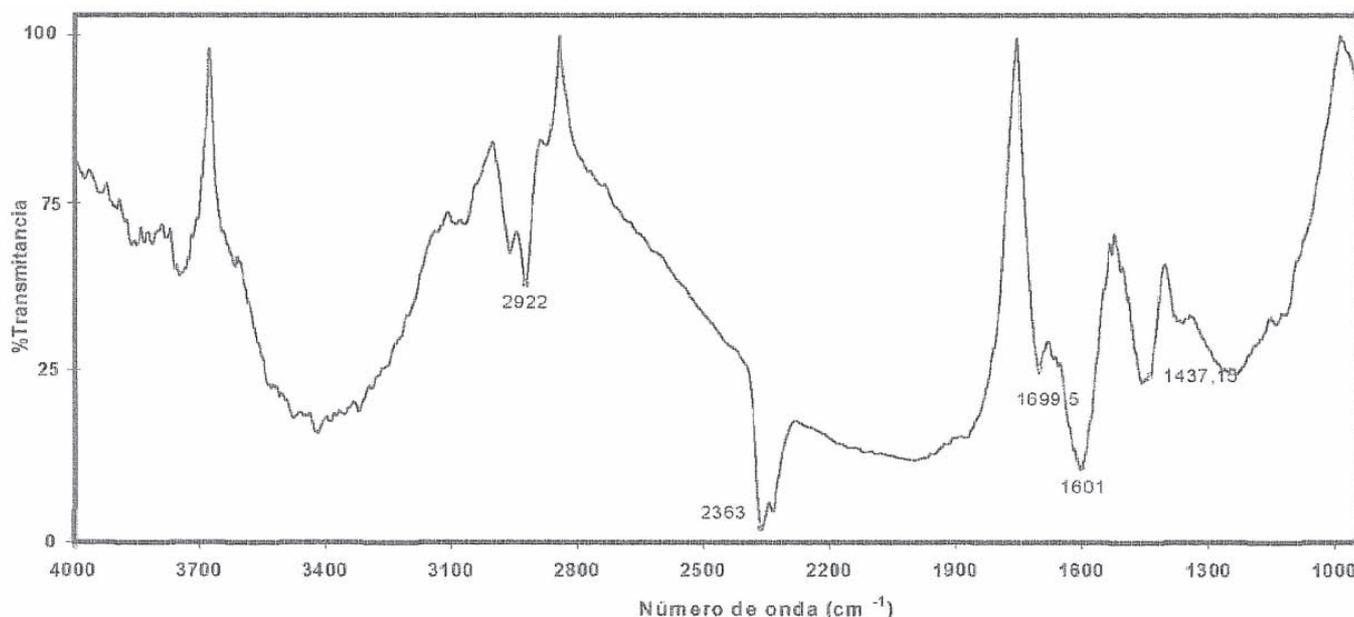
a Calculado por diferencia. BC bagazo de caña de azúcar, material vegetal de partida. ZM zuro de maíz material vegetal de partida. BC-A bagazo activado. ZM-A zuro activado. ZM-C zuro carbonizado. BC-C bagazo de caña de azúcar carbonizado.

especies, de fórmula general  $H_{n+2}P_nO_{3n+1}$  (Hsisheng & Hsu, 1998). A la temperatura de activación, los ácidos polifosfóricos no sufren descomposición o evaporación ya que esta ocurre entre 600-800°C (Hsisheng & Hsu, 1998; Huidobro *et al.* 2000) por lo que en la activación no ocurrió una notable pérdida de peso como en la carbonización. Después de la activación de los materiales carbonizados, hubo un aumento en su contenido de cenizas; este aumento puede ser atribuido a las interacciones entre el fósforo del ácido fosfórico y la materia mineral proveniente del bagazo de caña de azúcar y zuro de maíz (Hsisheng & Hsu, 1998).

**Modificaciones de los carbones activados.** Las pérdidas de peso para cada uno de los tratamientos a los cuales fueron sometidos los carbones fueron ZM-C, 62%; ZM-A, 21%; ZM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 22%; ZM-HNO<sub>3</sub>, 54%; ZMA, 10%; BC-C, 65%; BC-A, 23%; BC-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 22%; BC-HNO<sub>3</sub>, 57%; y BCA, 11%. La carbonización causó una pérdida significativa de peso, mayor del 62% del peso del bagazo y del zuro; de igual forma, el tratamiento de los carbones activados con ácido nítrico causó una pérdida de peso mayor del 50%. La pérdida de peso originada por el tratamiento térmico de los carbones activados fue menor que la ocasionada por las oxidaciones con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno; lo anterior indica que los agentes oxidantes en el proceso de oxidación debilitaron las paredes de los poros generando pérdida de carbón en la matriz carbonosa.

**Análisis infrarrojo.** La Interpretación de los espectros infrarrojos con transformada de Fourier con reflectancia difusa (DRIFTS) es complicada por el hecho que cada grupo origina varias bandas por lo que cada banda podría incluir contribuciones de varios grupos (Figueiredo *et al.* 1999). La Figura 2 muestra el espectro DRIFTS, números de onda ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) vs. porcentaje de transmitancia, de BC-C. se encontraron bandas a 1200  $\text{cm}^{-1}$  (C-O en éteres); 1049-1276  $\text{cm}^{-1}$  (alcoholes); 1100  $\text{cm}^{-1}$  y 3400  $\text{cm}^{-1}$  (C-OH fenólico); 1585-1600  $\text{cm}^{-1}$  (C=C aromático); 2900  $\text{cm}^{-1}$  (C-H alifático); y 1150  $\text{cm}^{-1}$ , 1700  $\text{cm}^{-1}$ , 3400  $\text{cm}^{-1}$  (ácidos carboxílicos); en las regiones  $\sim 3400$  y  $\sim 1700$   $\text{cm}^{-1}$  los carbones oxidados presentaron bandas más pronunciadas que los originales indicando el aumento de grupos oxigenados a causa de la oxidación. La banda alrededor de 1590  $\text{cm}^{-1}$ , que producen todos los carbones, puede ser atribuida a estiramientos de dobles enlaces de anillos aromáticos conjugados a grupos carbonílicos.

**Acidez de los carbones.** La Tabla 2 muestra el contenido de grupos ácidos y básicos de los carbones preparados; el pH de las suspensiones acuosas de los carbones fue ácido, (2.9 a 6.5), lo cual significa que estos carbones mostraban una predominancia de grupos funcionales ácidos en su superficie, importantes para el proceso de adsorción de metales. El post-tratamiento térmico a 600 °C no modificó la acidez de los carbones pues los grupos básicos se forman a temperaturas mayores de 800°C (Studebaker, 1957); esto sugiere que los sitios básicos de



**Figura 2.** Espectro DRIFTS de BC-C con bandas que indican la presencia de grupos oxigenados propicios para la adsorción de metales.

**Tabla 2.** Parámetros texturales y acidez de los carbones obtenidos. El área externa se obtuvo del valor de la pendiente del *t-plot*.

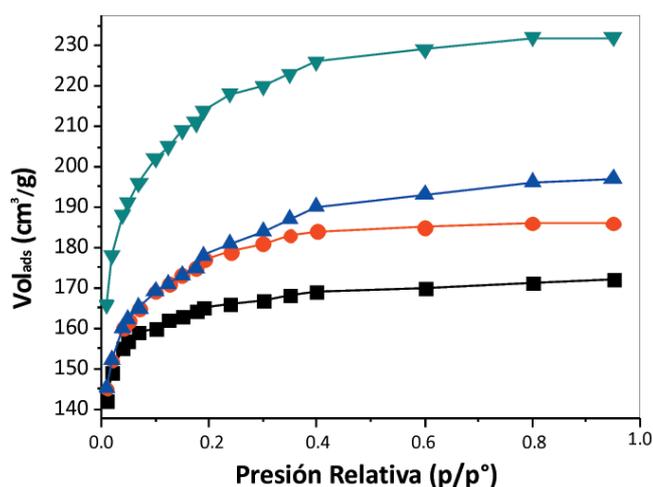
Carbón	Área de microporos (m <sup>2</sup> /g)	Área externa (m <sup>2</sup> /g)	Área total (m <sup>2</sup> /g)	Volumen de microporos (cm <sup>3</sup> /g)	Acidez Total (meq NaOH/g)	pH
ZM-A	580.1±0.4	198.1±0.1	778.3±0.7	0.2±0.1	1.68±0.07	5.7±0.2
ZM-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	527.9±0.1	135.9±0.1	663.8±0.3	0.2±0.1	2.05±0.02	5.1±0.1
ZM-HNO <sub>3</sub>	512.2±0.2	94.4±0.1	606.4±0.3	0.2±0.1	1.86±0.02	5.0±0.1
ZMA	534.3±0.4	124.9±0.7	659.1±0.1	0.2±0.1	1.71±0.02	5.3±0.1
BC-A	278.3±0.1	90.5±0.3	368.7±0.1	0.2±0.1	1.68±0.05	2.9±0.1
BC-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	446.4±0.1	92.8±0.5	539.2±0.2	0.1±0.1	2.12±0.02	2.9±0.2
BC-HNO <sub>3</sub>	401.7±0.3	57.6±0.2	459.3±0.3	0.2±0.1	1.68±0.05	3.2±0.1
BCA	416.7±0.1	76.8±0.1	493.5±0.3	0.2±0.1	1.75±0.01	3.2±0.1

superficie son esencialmente del tipo de Lewis, asociado con regiones  $\pi$  ricas en electrones (Lopez-Ramon *et al.* 1999); en general, las oxidaciones incrementaron la acidez de ZM-A y BC-A, especialmente la oxidación con peróxido de hidrógeno; en ZMA y BCA se mantuvo la acidez total presente en ZM-A y BC-A. La tabla 2 también nos muestra que: a. El carbón con mayor área superficial fue ZM-A (área total  $778.3 \pm 0.7$  m<sup>2</sup>/g); b. Los carbones activados originarios de zuro de maíz presentaron mejores parámetros texturales que los correspondientes a bagazo de caña; y c. La basicidad total (meq HCl/g) fue cero para todos los carbones indicando que los carbones eran ácidos.

**Análisis de las isothermas.** Las isothermas de adsorción de nitrógeno de los materiales carbonizados (no mostradas) no se ajustaron a los tipos de isothermas de BET y mostraron que no existió adsorción de nitrógeno. En cambio, todas las isothermas de los carbones activados fueron del tipo I (BET) (Gregg & Sing, 1991). En casi todos los carbones activados y modificados, 70% del volumen de poros fue llenado a presiones relativas de 0.1 ( $p/p_0$ ) (Figura 3) indicando que estas muestras eran altamente microporosas (diámetro de poros menor de 20 Å) (Juntgen, 1986); de acuerdo a las isothermas, los carbones con mayor área superficial fueron ZM-A y BC-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Influencia de las modificaciones en el área superficial.** La activación con ácido fosfórico desarrolló la porosidad de los carbones y aumentó el área superficial (Tabla 2); esta porosidad puede atribuirse al carácter deshidratante del ácido fosfórico que promovió reacciones de hidrólisis ácida (Marsh *et al.* 1997). Las modificaciones alteraron las áreas superficiales específicas de los carbones activados de una forma diferente lo que indica diferencias importantes de las estructuras y características de los materiales vegetales de partida.

El material vegetal que mejor desarrolló sus propiedades adsorptivas durante la carbonización y la activación


**Figura 3.** Isothermas tipo I (BET) de los carbones activados que indican que las muestras son microporosas: ZM-A▼, ZM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>▲, ZMD-, ZM-HNO<sub>3</sub>■.

fue el zuro de maíz con una área total de 778 m<sup>2</sup>/g (Tabla 2) comparable a la de carbones activados comerciales (Norit, 1999).

**Adsorción de cadmio y plomo en los carbones.** Puesto que la naturaleza química de los carbones es similar, las diferencias encontradas en la capacidad de adsorción podrían ser debidas a características superficiales como área y volumen. Los resultados de adsorción de plomo y cadmio están dados en la Tabla 3 y la Figura 4.

**Adsorción de plomo.** Las mayores capacidades de adsorción de plomo la mostraron ZM-A, ZMA y BCA (~0.037 meq/g) y la menor la mostró ZM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.027 meq/g). Las capacidades de adsorción de plomo de los demás carbones (~0.033 meq/g) fueron estadísticamente iguales; la ubicación de grupos oxigenados a la entrada de los poros, que impiden la difusión de los metales al interior de

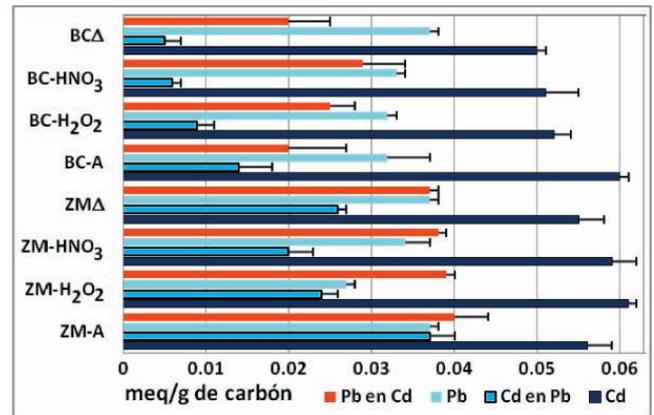
los mismos, se ha usado para explicar la menor adsorción de metales por parte de algunos carbones (**Pradhan & Sandle, 1999**); esto podría indicar porque algunos carbones con mayor acidez y área de microporos tienen una baja capacidad de adsorción.

*Adsorción de cadmio.* La mayor capacidad de adsorción de cadmio la mostró ZM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.061 meq/g), pero fue estadísticamente igual a las de ZM-A, ZM-HNO<sub>3</sub>, y BC-A (~0.059 meq/g); la menor capacidad de adsorción de cadmio la mostraron BC-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, BC-HNO<sub>3</sub> y BCΔ (~0.051 meq/g) (Tabla 3).

En general, la capacidad de adsorción de Cd fue mayor cuando estaba solo que en presencia de plomo, (Figura 4). Además, los metales fueron mejor removidos cuando estaban solos, debido a que no tenían que competir con el otro metal por los sitios activos de la superficie del carbón; la Figura 4 muestra que todos los carbones presentaron mayor selectividad para adsorber cadmio que plomo ( $p < 0.05$ ); esto se atribuye a que el ion cadmio es más pequeño que el plomo y por lo tanto va a tener mayor velocidad de difusión, mayor acceso a los poros y mayor posibilidad de ser adsorbido. La mezcla de los metales afectó más la adsorción de Cd que la de Pb (Figura 4); la mayor adsorción de Cd y Cd en presencia de Pb la mostró ZM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la mayor adsorción de Pb y Pb en presencia de Cd la presentaron ZM-A y ZM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La capacidad de adsorción de metales dependió de una forma compleja de una combinación de varias propiedades de los carbones.

## Conclusiones

Se prepararon carbones activados con bagazo de caña de azúcar y zuro de maíz para adsorber cadmio y plomo de soluciones acuosas. El bagazo de caña y zuro de maíz



**Figura 4.** Capacidad de adsorción de cadmio y plomo de los carbones; los carbones adsorbieron más cadmio que plomo.

fueron carbonizados, activados con ácido fosfórico y oxidados con ácido nítrico o peróxido de hidrógeno y posteriormente calcinados en atmósfera de nitrógeno. La activación con ácido fosfórico causó un aumento en el área superficial. En general, una mayor cantidad de grupos oxigenados fue fijada por el oxidante peróxido de hidrógeno y se observó un aumento en la cantidad de grupos ácidos con las oxidaciones. Se obtuvieron carbones activados con altas capacidades de adsorción de cadmio y plomo que por lo general dependieron de la porosidad de los carbones. Los carbones activados fueron más selectivos para adsorber cadmio que plomo. En general, los metales se removieron con mayor facilidad cuando se encontraban solos que combinados y la adsorción de plomo fue afectada más por la presencia de cadmio que lo contrario. La implementación de este método de activación en dos etapas no favoreció la capacidad de adsorción de los carbones activados.

**Tabla 3.** Capacidades de adsorción de cadmio y plomo observadas  $\pm$  desviación estándar de los carbones en meq/g.

Carbón	Cd (II)	Pb (II)	Cd (II) en presencia de Pb	Pb (II) en presencia de Cd
ZM-A	0.056 $\pm$ 0.003	0.037 $\pm$ 0.001	0.037 $\pm$ 0.003	0.040 $\pm$ 0.004
ZM-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.061 $\pm$ 0.001	0.027 $\pm$ 0.001	0.024 $\pm$ 0.002	0.039 $\pm$ 0.001
ZM-HNO <sub>3</sub>	0.059 $\pm$ 0.003	0.034 $\pm$ 0.003	0.020 $\pm$ 0.003	0.038 $\pm$ 0.001
ZMΔ	0.055 $\pm$ 0.003	0.037 $\pm$ 0.001	0.026 $\pm$ 0.001	0.037 $\pm$ 0.001
BC-A	0.060 $\pm$ 0.001	0.032 $\pm$ 0.005	0.014 $\pm$ 0.004	0.020 $\pm$ 0.007
BC-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.052 $\pm$ 0.002	0.032 $\pm$ 0.001	0.009 $\pm$ 0.002	0.025 $\pm$ 0.003
BC-HNO <sub>3</sub>	0.051 $\pm$ 0.004	0.033 $\pm$ 0.001	0.006 $\pm$ 0.001	0.029 $\pm$ 0.005
BCΔ	0.050 $\pm$ 0.001	0.037 $\pm$ 0.001	0.005 $\pm$ 0.002	0.020 $\pm$ 0.005

## Referencias

- Arpa, C., E., Basyilmaz, S., Bektas, O., Genc, Y., Yurum. 2000. Cation exchange properties of low Turkish coals: removal of Hg, Cd and Pb from wastewater. *Fuel Process. Technol.* **68**(2):111-120.
- Berkowitz, N. 1957. On the Differential Thermal Analysis of Coal, *Fuel* **36**:355-373.
- Boehm, H. P. 1994. Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons. *Carbon* **32**(5):759-769.
- Burns, C. A., P. J., Cass, I., Harding, H., Russell, J., Crawford. 1999. Adsorption of aqueous heavy metals onto carbonaceous substrates. *Colloids and surfaces* **155**(1):63-68.
- Castilla, M., M. V., Lopez-Ramon, F., Carrasco-Marin. 2000. Changes in surface chemistry of activated carbons by wet oxidation. *Carbon* **38**(14):1995-2001.
- Cui, H., S. Q., Turn. 2009. Adsorption/desorption of dimethylsulfide on activated carbon modified with iron chloride. *Appl Catal B Environ* **88**(1-2):25-31.
- Figueiredo, J. L., M.F. R., Pereira, M. M. A., Freitas, y J. J. M., Orfao. 1999. Modification of the surface chemistry of activated carbons. *Carbon* **37**(9):1379-1389.
- Gan, T., K., Wu. 2008. Sorption of Pb (II) using hydrogen peroxide functionalized activated carbon, *Colloids Surf. A: Physicochem Eng Aspects* **330**(2-3):91-95.
- Garoma, T., S., Shah, B., Badriyha. 2010. Removal of Cadmium, Copper, and Zinc from Aqueous Solution by Activated Carbon Impregnated with 8-Hydroxyquinoline. *J Environ Sci Eng* **4**(5):14-21.
- Gregg, S. J., K. S. W., Sing. 1991. Adsorption, surface area and porosity. Academic press Inc. New York.
- Haenel, M. W. 1982. Chemistry of Coal Utilization, Second Supplementary Volume. Herausgegeben von M. A. Elliot. Wiley-Interscience, New York, 1981. *Angew Chem* **94**(6):469-470.
- Hao, Y. N., X. M., Wang. 2010. Adsorption of Basic Fuchsin onto Xanthoceras Sorbifolia Bunge Crust Activated Carbon Developed by Sodium Hydroxide. *Adv Mater Res* **156-157**:272-278.
- He, X-C., J-T., Zheng, W-Z., Yu, G-C., Wang X-F., Qu. 2008. Modification of activated carbon by ozone and its thermodynamics and kinetics of the adsorption for thiophene. *Acta Petrolei Sinica (Petrol. Proc. Section)*. 2008-04.
- Hsisheng, T., T-S., Yeh, L-Y., Hsu. 1998. Preparation of Activated Carbon from Bituminous Coal with Phosphoric Acid Activation. *Carbon* **36**(9):1387-1395.
- Huidobro, A., A. C., Pastor, F., Rodríguez-Reinoso. 2000. Preparation of Activated Carbon Cloth from Viscous Rayon. Part IV. Chemical Activation. *Carbon* **39**(3):389-398.
- Juntgen, H. 1986. Activated Carbon as Catalyst Support. *Fuel* **65**(10):1436-1446.
- Kilic, M., E., Apaydin-Varol, A. E., Pütün. 2011. Adsorptive removal of phenol from aqueous solutions on activated carbon prepared from tobacco residues: Equilibrium, kinetics and thermodynamics. *J Hazard Mat* **189**(1-2):397-403.
- Kim, D., Y. W., Jung, S., Kwon, J-W., Park. 2011. Adsorption of cadmium(II) from aqueous solutions by thiol-functionalized activated carbon. *Water Sci. Technol.: Water Suppl.* **11**(1):61-66.
- Kudo, K., E., Yoshida. 1957. On the decomposition process of wood constituents in the course of carbonization. *J. Jap. Wood Res Soc* **3**(4):125-127.
- Li, Y., Q., Dua, X., Wang, P., Zhang, D., Wang, Z., Wang, Y., Xia. 2010. Removal of lead from aqueous solution by activated carbon prepared from *Enteromorpha prolifera* by zinc chloride activation. *J Hazard Mat* **183**(1-3):583-589.
- Lopez-Ramon, M. V., F., Stoeckli, C., Moreno-Castilla, F., Carrasco-Marin. 1999. On the characterization acidic and basic surface sites on carbons by various techniques. *Carbon* **37**(8):1215-1221.
- Macias-Garcia, A., V., Gomez-Serrano, M. F., Alexandre-Franco, C., Valenzuela-Calahorro. 2003. Adsorption of cadmium by sulphur dioxide treated activated carbon. *J Hazard Mat* **103**(1-2):141-152.
- Marsh, H., E. A., Heintz, F., Rodríguez-Reinoso. 1997. Introduction to Carbon Technology. Capitulo 2. Universidad de Alicante, Secretariado de Publicaciones. Alicante, España.
- Navarrete, L. F., L., Giraldo, M. C., Baquero. 2005. Activated carbon: effect of the washing with sulfuric acid of the lignocellulosic precursor, shell of african palm, on the processes of carbonization and activation. *Rev Colomb Quim* **34**(1):67-78.
- Norit. Norit RO 3515. 1999. Características del producto.
- Pradhan, B. K., N. K., Sandle. 1999. Effect of different oxidizing agent treatments on the surface properties of activated carbons. *Carbon* **37**(8):1323-1332.
- Rajakovic, L. V., M. D., Ristic. 1996. Sorption of boric acid and borax by activated carbon impregnated with various compounds. *Carbon* **34**(6):769-774.
- Rodríguez-Reinoso, F., M., Molina-Sabio. 1998. Carbones activados a partir de materiales lignocelulósicos. *Quibal. Química e Industria* **45**(9):563-571.
- Rosas, J. M., J., Bedia, J., Rodriguez-Mirasol, T., Cordero. 2009. HEMP-derived activated carbon fibers by chemical activation with phosphoric acid. *Fuel* **88**(1):19-26.
- SCFI (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial). 1982. Norma mexicana NMX-B-158-1982, métodos para determinar el azufre total en la muestra de carbón y coque. <http://200.77.231.100/work/normas/nmx/1982/nmx-b-158-1982.pdf>
- ShamsiJazeyi, H., T., Kaghazchi. 2010. Investigation of nitric acid treatment of activated carbon for enhanced aqueous mercury removal. *J Ind Eng Chem* **16**(5):852-858.
- Singh, B., P., Lal. 2010. Preparation and characterization of activated carbon spheres from polystyrene sulphonate beads

by steam and carbon dioxide activation. *J Appl Polym Sci* **115**(4):2409-2415.

**Song, X., H., Liu, L., Chenga, Y., Qu.** 2010. Surface modification of coconut-based activated carbon by liquid-phase oxidation and its effects on lead ion adsorption. *Desalination* **255**(1-3):78-83.

**Stuebaker, M. L.** 1957. The Chemistry of Carbon Black and Reinforcement. *Rubber Chem Technol* **30**:1400-1484.

**Tongpoothorn, W., M., Sriuttha, P., Homchan, S., Chanthai, C., Ruangviriyacha.** 2011. Preparation of activated carbon derived from *Jatropha curcas* fruit shell by simple thermochemical activation and characterization of their physicochemical properties. *Chem Eng Res Des* **89**(3):335-340.

Recibido: julio 19 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.