



**Revista  
Colombiana  
de Química**

**Volumen 42, No. 2, mayo-agosto de 2013**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

## Edición

© Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias - Departamento de Química  
Sede Bogotá

ISBN versión impresa: 0120-2804  
ISBN versión electrónica: 2357-3791  
DOI de la publicación by CrossRef.org:  
<http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim>

## Indizada en

Publindex- Índice Bibliográfico Nacional (categoría A2 - dic 2013)  
Chemical Abstracts  
SciELO Colombia  
Scopus Q4 (SJR/2013: 0,112)  
Latindex  
Redalyc  
Directory of Open Access Journals (DOAJ)

## Periodicidad

Cuatrimestral

## Contacto

Departamento de Química  
Universidad Nacional de Colombia  
Apartado Aéreo 5997  
Bogotá, D.C., Colombia  
Fax: 571- 3165220  
Correo electrónico: [rcolquim\\_fcbog@unal.edu.co](mailto:rcolquim_fcbog@unal.edu.co)

## Consulta Open Acces

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim>  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_serial&pid=0120-2804&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0120-2804&lng=es&nrm=iso)

## Director Revista

Oscar Rodríguez Bejarano, Dr. Sc., Universidad Nacional de Colombia

## Comité Editorial

Cristian Blanco Tirado, Ph. D., Universidad Industrial de Santander.  
Francisco Carrasco Marín, Dr. Sc., Universidad de Granada, España.  
Leonardo Castellano Hernández, Dr. Sc., Universidad Nacional de Colombia.  
Pedro Joseph-Nathan, Dr. Sc., Instituto Politécnico Nacional, México.  
Sonia Moreno Guáqueta, Dr. Sc., Universidad Nacional de Colombia.  
Cristian Ochoa Puentes, Dr. Rer. Nat., Universidad Nacional de Colombia.  
Luz Patricia Restrepo Sánchez, M. Sc., Universidad Nacional de Colombia.  
Juscelino Tovar, Dr. Sc., Universidad Central de Venezuela.

## Comité Científico

Gustavo Adolfo González Aguilar, Dr. Sc., Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo (México)  
Ljubisa R. Radovic, Dr. Sc., Pensilvania State University (USA)  
Augusto Rivera Umaña, Dr. Sc., Universidad Nacional de Colombia  
Fabio Zuluaga Corrales, Dr. Sc., Universidad del Valle (Colombia)  
Kushalappa Ajjamada, Ph. D., McGill University (Canadá)

## Suscripciones y canje

Valor del ejemplar \$10.000; suscripción anual \$30.000 y US\$30 para el exterior, incluyendo en ambos casos el envío. Los pagos en Colombia deben realizarse mediante consignación en la cuenta de ahorros N° 220012720017 del Banco Popular, a nombre de Fondo Especial, Facultad de Ciencias U.N. Desde el exterior los pagos deben hacerse mediante cheque de un banco de Estados Unidos girado a nombre de Fondo Especial, Facultad de Ciencias U.N. o mediante transferencia electrónica a la cuenta citada anteriormente. Por favor enviar cheques y fotocopias de giros o consignaciones a la dirección de la Revista Col. de Química.

Para canjes dirigirse al SINAB: [bibteca\\_bog@unal.edu.co](mailto:bibteca_bog@unal.edu.co) ó [cevelascoza@unal.edu.co](mailto:cevelascoza@unal.edu.co)

## Propósito y alcance

La Revista Colombiana de Química es publicada cuatrimestralmente por el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Publica contribuciones provenientes de la investigación en las diversas áreas de la química. El contenido de los artículos debe ser original, inédito y no debe haber sido enviado, total o parcialmente, para publicación a otra revista. El Comité Editorial se reserva el derecho de reproducción de los trabajos aceptados. Su publicación en otro medio requiere permiso del editor. La revista está dirigida a estudiantes y profesionales relacionados con cualquier área de la química.

## Preparación editorial

Carlos Andrés Peña, asistente editorial  
Coordinación de Publicaciones, Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.  
Cuidado editorial: Camilo Baquero.  
Diseño y maquetación: Diego Villate.  
Impresión. Disonex S.A.

## Química Orgánica y Bioquímica

Aqueous citric acid as “green” reaction media for the synthesis of octahydroxanthones  
Ácido cítrico acuoso como medio de reacción “verde” en la síntesis de octahidroxantenos  
Ácido cítrico aquoso como meio de reação “verde” para a síntese de octaidroxantenos  
*Camilo A. Navarro, Cesar A. Sierra, Cristian Ochoa-Puentes* **5-11**

Producción y purificación de anticuerpos aviares (IgYs) a partir de cuerpos de inclusión  
de una proteína recombinante central en el metabolismo del NAD<sup>+</sup>  
Production and purification of avian antibodies (IgYs) from inclusion bodies of a recombinant  
protein central in NAD<sup>+</sup> metabolism **12-20**  
Produção e purificação de anticorpos aviários (IgYs) empregando os corpos de inclusão  
de uma proteína recombinante importante para o metabolismo do NAD<sup>+</sup>  
*Paula A. Moreno-González, Gonzalo J. Díaz, María H. Ramírez-Hernández*

## Química Aplicada y Analítica

Capacidad antioxidante del arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) durante la maduración  
Antioxidant capacity of araza (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) during the ripening  
Capacidade antioxidante de aracá-boi (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) durante a maturação  
*Fabio A. Cuellar, Edna Ariza, Cecilia Anzola, Patricia Restrepo* **21-28**

Evaluación del movimiento de plaguicidas hacia la cuenca del Lago de Tota, Colombia  
Evaluation of pesticides movement towards Tota Lake catchment, Colombia **29-38**  
Avaliação de pesticida movimento em direção Tota bacia do Lago, Colombia  
*Andrea Mojica, Jairo A. Guerrero*

Residuos de plaguicidas en cultivos de pasifloras en regiones de alta producción en Colombia  
Pesticides residues in Passifloras crops in Colombian high production regions **39-47**  
Resíduos em culturas passiflora nas regioes de producao elevados em Colombia  
*Dario A. Bastidas, Jairo A. Guerrero, Kris Wyckhuys*

## Fisicoquímica y Química Inorgánica

Autoensamblaje de un cuadrado supramolecular a partir del complejo [Ni(dppe)(TOF)<sub>2</sub>] con 4,4'-bipiridina  
Self-assembly of a supramolecular square between [Ni(dppe)(TOF)<sub>2</sub>] and 4,4'-bipyridine **48-55**  
Automontagem de um quadrado supra-molecular a partir do complexo [Ni(dppe)(TOF)<sub>2</sub>] com 4,4'-bipiridina  
*Paulo Torres Palacio, Cristian A. Cano Benítez, Álvaro Duarte Ruiz*



## Aqueous citric acid as “green” reaction media for the synthesis of octahydroxanthenes

## Ácido cítrico acuoso como medio de reacción “verde” en la síntesis de octahidroxantenos

## Ácido cítrico aquoso como meio de reação “verde” para a síntese de octaidroxantenos

### Abstract

A simple, convenient and environmentally friendly one-pot procedure for the synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes by the reaction of dimedone and aromatic aldehydes in aqueous citric acid is described. In this green synthetic protocol promoted by the reaction media, the use of any other catalysts and hazardous organic solvents are avoided, making the work up procedure greener and easier. The isolation of the products, obtained in good yields, is readily performed by filtration and crystallization from ethanol when required and the aqueous acidic media can be easily recycled and reused several times without significant loss of catalytic activity.

**Keywords:** Citric acid, dimedone, green synthesis, octahydroxanthenes.

### Resumen

En esta contribución se describe un procedimiento one-pot simple, conveniente y medioambientalmente amigable para la síntesis de 1,8-dioxo-octahidroxantenos mediante la reacción de dimedona y aldehídos aromáticos en ácido cítrico acuoso. En este protocolo de síntesis “verde”, promovido por el medio de reacción, se elimina el uso de otros catalizadores y solventes orgánicos peligrosos, haciendo el tratamiento final de la reacción más fácil y “verde”. El aislamiento de los productos, obtenidos con buenos rendimientos, se lleva a cabo mediante filtración y recristalización en etanol cuando es necesario y el medio acuoso ácido puede ser reciclado y reutilizado varias veces sin pérdida significativa de la actividad catalítica.

**Palabras clave:** ácido cítrico, dimedona, síntesis verde, octahidroxantenos.

### Resumo

É descrito um procedimento simples, conveniente, e ambientalmente amigável para a síntese de 1,8-dioxo-octaidroxantenos pela reação de dimedona e aldeídos aromáticos em ácido cítrico aquoso em uma só etapa. Em este protocolo de síntese verde, promovido pelo meio de reação, a utilização de algum outro catalisador e solvente orgânico perigoso é evitada, fazendo o procedimento mais fácil e mais “verde”. O isolamento dos produtos, obtidos em grande rendimento, é feito por meio de filtração e cristalização a partir de etanol quando é requerido e o meio aquoso ácido pode ser facilmente recuperado e reutilizado várias vezes sem perder significativamente sua atividade catalítica.

**Palavras-chave:** ácido cítrico, dimedona, síntese verde, octaidroxantenos.

## Introduction

XANTHENES ARE A VERY INTERESTING CLASS of oxygen-containing heterocycles with a large number of naturally occurring and synthetic derivatives (1-6). A variety of xanthenes and derivatives based on this nucleus exhibit potential applications in the field of medicinal chemistry and materials science as anti-viral (7), anti-bacterial (8), and anti-inflammatory agents (9), as fluorescent materials (10), in photodynamic therapy (11, 12), dyes (13), luminescent sensors (14), and laser technologies (15).

Recently enormous efforts has been made in expanding the scope of the synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes, being the condensation of the appropriate aldehyde and dimedone or 1,3-ciclohexanedione

the commonly performed method for obtaining these heterocyclic compounds. Several synthetic procedures using alternative solvents (16), solvent-free conditions with different catalysts (17-23), ionic liquids (24-27), homogeneous (28-30), and heterogeneous (31-38) catalysts, as well as microwave (39) and ultrasound-assisted (40-44) synthesis have been reported. Although many of the reported methods are effective, some of them require a previous preparation of the catalyst or involve the use of expensive reagents, toxic solvents, tedious work-up, low yields, long reaction times and harsh reaction conditions.

Citric acid is a low-cost, non-volatile, stable, readily available weak organic acid produced by several microbial fermentation processes, substrates and microorganisms (45). It is a natural preservative and antioxidant available in vegetables and fruits, most notably in citrus fruits

where it constitutes around 8% of the dry weight. In food chemistry, this acid has been used in the production of candies, fruit juice, ice cream, marmalade, jelly, also to suppress the browning process in fruits and as a synergistic compound for antioxidants (46). Citric acid forms a wide range of salts and complexes with metals like copper, iron, manganese, magnesium and calcium, being this the reason for its use as a sequestering agent in industrial processes and as an anticoagulant blood preservative. In fats and oils citric acid acts as antioxidant reducing the metal-catalysed oxidation by chelating traces of metals such as iron. Other pharmaceutical and industrial applications include antioxidant (vitamins and cosmetics), salt formation (iron preparations), sequestering (cleaning metals, polymerizations) and buffering (detergents and photography) (47). In the field of organic synthesis, this acid has been used as efficient promoter of the Beckmann rearrangement (48, 49) and for the synthesis of dihydropyrimidin-(2H)-ones (50), 2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-ones (51) and quinolones (52).

Recently, we described the simultaneous synthesis and photophysical characterization of decahydroacridine-1,8-diones and 1,8-dioxo-octahydroxanthenes, where a competitive one-pot reaction yielding both products was achieved under refluxing acetic acid (53). In connection with our ongoing studies on the photophysical properties of chromophoric compounds (54) and motivated for the aforementioned results, we decide to develop a green synthetic methodology, in which a selected group of xanthene derivatives could be obtained avoiding harsh conditions.

In the present work, we report an efficient, convenient and environmentally friendly one pot procedure for the synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes by the use of aqueous citric acid as a green reaction media which promoted the reaction.

## Materials and methods

### General

All chemicals were purchased from Merck, Aldrich and Fluka Chemical companies and used without further purification. Absolute ethanol and glacial acetic acid were used as solvent for some reactions. Solutions of organic acids were prepared in distilled water. Melting points were determined using open glass capillaries on a Stuart SMP10 melting point apparatus and are uncorrected. The infrared spectra (IR) were recorded using a Shimadzu IR prestige 21 FT-IR™ instrument with potassium bromide pellets. The <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) and <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) spectra were measured in CDCl<sub>3</sub> using a Bruker Avance 400™ spectrometer and chemical shifts are expressed in δ ppm using TMS as internal standard. HPLC-MS analyses was performed in a Shimadzu LCMS-IT-TOF™ equipment (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an electrospray ionisation (ESI) probe. The electrospray ionization (ESI) probe was operated simultaneously in the positive and negative mode: CDL, 250 °C; block at 200 °C; flow gas (N<sub>2</sub>) at 1,5 L/min; CDL voltage, 1,8 kV; ion accumulation, 20 ms; and scan range m/z, 100–2000 u. The energy of the collision gas (Argon) was fixed at 50%. LCMS Solution software was used for data collection and analysis. All reactions were conducted in a 5 mL capped flask equipped with a magnetic stirring.

### General synthetic methodology

A mixture of the selected aldehyde (0.5 mmol) and 5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione (1,0 mmol) in 0.3 M citric acid (2.0 mL) was stirred at 90 °C for the appropriate time. After reaction completion (TLC), the formed solid was filtered, washed with water and recrystallized from ethanol when required.

## Selected spectral data

### 3,3,6,6-Tetramethyl-9-phenyl-3,4,5,6,7,9-hexahydro-1H-xanthene-1,8-(2H)-dione 3a

*White solid.* Yield 85% (148 mg, 0.42 mmol), mp 204–206 °C. FT-IR (KBr pellet, cm<sup>-1</sup>): 2956, 2854, 1662, 1491. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.30 (dd, 2H, <sup>3</sup>J= 7.0 Hz, <sup>4</sup>J= 1.5 Hz), 7.23 (t, 2H, <sup>3</sup>J= 7.2 Hz), 7.12 (t, 1H, <sup>3</sup>J= 7.3 Hz), 4.77 (s, 1H), 2.48 (s, 4H), 2.25 (d, 2H, <sup>2</sup>J= 16.3 Hz), 2.18 (d, 2H, <sup>2</sup>J= 16.3 Hz), 1.12 (s, 6H), 1.01 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 196.3, 162.2, 144.1, 128.3, 128.0, 126.3, 115.6, 50.7, 40.8, 32.2, 31.8, 29.2, 27.3. HRMS (ESI-TOF) calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>O<sub>3</sub>: [M+H]<sup>+</sup>: 351.1882; found: 351.1882.

### 9-(4-(Dimethylamino)phenyl)-3,3,6,6-tetramethyl-3,4,5,6,7,9-hexahydro-1H-xanthene-1,8(2H)-dione 3c

*White solid.* Yield 80% (157.4 mg, 0.40 mmol), mp 219–221 °C. FT-IR (KBr pellet, cm<sup>-1</sup>): 2952, 2875, 1659, 1572. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.14 (d, 2H, <sup>3</sup>J= 8.8 Hz), 6.60 (d, 2H, <sup>3</sup>J= 8.7 Hz), 4.66 (s, 1H), 2.87 (s, 6H), 2.45 (s, 4H), 2.23 (d, 2H, <sup>2</sup>J= 16.3 Hz), 2.17 (d, 2H, <sup>2</sup>J= 16.3 Hz), 1.09 (s, 6H), 1.00 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 196.6, 161.8, 128.9, 116.0, 112.4, 50.7, 40.8, 40.7, 32.2, 30.6, 29.2, 27.4. HRMS (ESI-TOF) calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>3</sub>: [M+H]<sup>+</sup>: 394.2304; found: 394.2333.

### 9-(4-Chlorophenyl)-3,3,6,6-tetramethyl-3,4,5,6,7,9-hexahydro-1H-xanthene-1,8(2H)-dione 3g

*White solid.* Yield 83% (159.5 mg, 0.41 mmol), mp 230–232 °C. FT-IR (KBr pellet, cm<sup>-1</sup>): 2954, 2875, 1661, 1573. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.13–7.24 (m, 4H), 4.71 (s, 1H), 2.46 (s, 4H), 2.21 (m, 4H), 1.10 (s, 6H), 0.99 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 196.3, 162.4, 142.7, 132.0, 129.8, 128.2, 115.83, 50.7, 40.9, 32.2, 31.5, 29.3, 27.3. HRMS (ESI-TOF) calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>ClO<sub>3</sub>: [M+H]<sup>+</sup>: 385.1492; found: 385.1501.

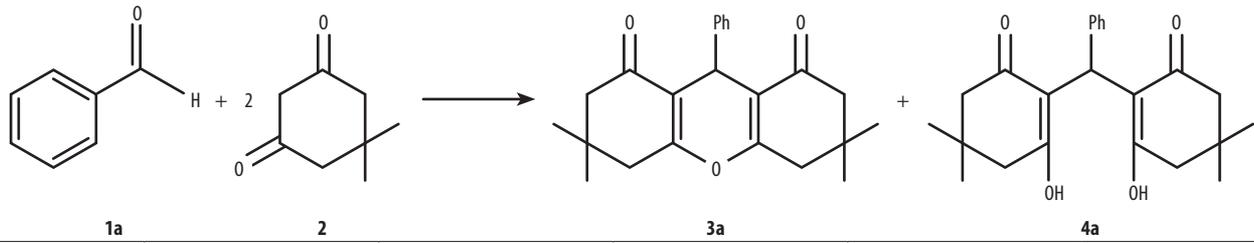
### 3,3,6,6-Tetramethyl-9-(2-nitrophenyl)-3,4,5,6,7,9-hexahydro-1H-xanthene-1,8(2H)-dione 3i

*Yellow solid.* Yield 78% (154.2 mg, 0.39 mmol), mp 258–261 °C. FT-IR (KBr pellet, cm<sup>-1</sup>): 2954, 2935, 1662, 1515, 1463. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.76 (d, 1H, <sup>3</sup>J= 7.3 Hz), 7.43 (m, 1H), 7.37 (d, 1H, <sup>3</sup>J= 7.4 Hz), 7.24 (m, 1H), 5.51 (s, 1H), 2.46 (s, 4H), 2.23 (d, 2H, <sup>2</sup>J= 16.3 Hz), 2.16 (d, 2H, <sup>2</sup>J= 16.3 Hz), 1.10 (s, 6H), 1.01 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 196.4, 196.4, 192.2, 163.0, 149.8, 131.9, 127.2, 124.6, 114.1, 50.6, 40.8, 32.1, 28.9, 27.6. HRMS (ESI-TOF) calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>5</sub>: [M+H]<sup>+</sup>: 396.1733; found: 396.1763.

## Results and discussion

Since our interest was focused on the development of a green synthetic methodology for the synthesis of a selected group of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes, the reaction of dimedone with benzaldehyde was used as a model reaction in order to find the best reaction conditions (Table 1).

The use of solvents like acetonitrile and dimethyl sulfoxide gave the tetraketone **4a** in very poor yields (Table 1, entries 2 and 4). On the other hand, ethanol, THF and water afforded the tetraketone **4a** in good yields; however formation of **3a** was not detected (TLC) (Table 1, entries 1, 3, and 5). As reported by Yu and co-workers (55), the formation of **4a** can be explained by the fact that these solvents may help in the enolization of dimedone by making hydrogen bonds with the OH of the enol form of **2** and, thus, it increases the nucleophilic character of the methylene carbon (C-2). In addition, water and ethanol can also increase the electrophilic character of the carbonyl carbon of benzaldehyde by forming hydrogen bonds with the carbonyl oxygen.

**Table 1.** Optimization of reaction conditions for the synthesis of **3a**<sup>a</sup>.


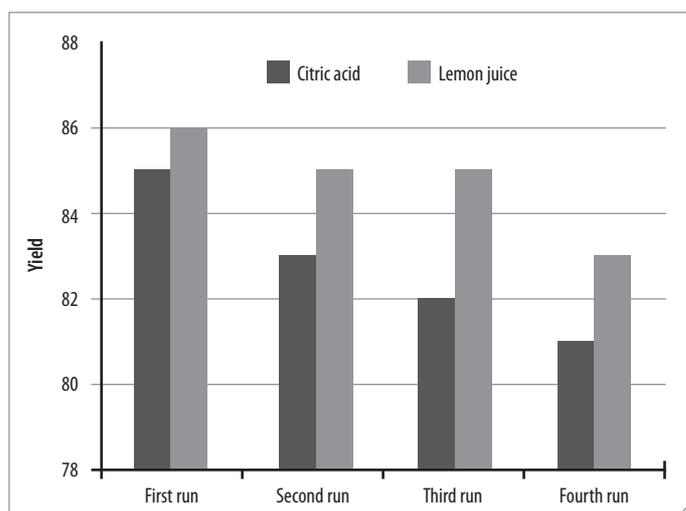
Entry	Time (h)	T (°C)	Solvent	Yield (%) <sup>b</sup>	
				3a	4a
1	6	70	EtOH	---	78
2	6	70	CH <sub>3</sub> CN	---	10
3	6	60	THF	---	80
4	6	100	DMSO	---	15
5	6	80	H <sub>2</sub> O	---	75
6	6	100	Acetic acid	65	---
7	8	100	Acetic acid 50%	58	---
8	6	90	0.3 M Oxalic acid	77	---
9	6	90	0.3 M Succinic acid	80	---
10	6	90	0.3 M Tartaric acid	78	---
11	6	90	0.3 M Citric acid	85	---
12	8	90	0.15 M Citric acid	50	20
13	6	90	Lemon juice	86	---

<sup>a</sup> **1a**: 0.5 mmol; **2**: 1.0 mmol; solvent: 2.0 mL. <sup>b</sup> Isolated yield.

It is known that the 1,8-dioxo-octahydroxanthenes can be obtained by intramolecular cyclization of **4a** promoted by acid catalysts (29, 31, 35). Therefore, acetic acid and other naturally occurring organic acids were examined for the obtention of **3a** (Table 1, entries 6 to 13). Acetic acid afforded **3a** with 65% yield, but a dilution of 50% decrease the yield to 58%. When 0.3 M solutions of oxalic, succinic,

tartaric and citric acid were used as reaction media, yields above 77% were obtained for compound **3a** and no tetraketone **4a** was detected (Table 1, entries 8 to 11). However, similarly to entry 7, when the concentration of citric acid decreased the compound is formed in a low yield together with **4a**. Interestingly, lemon juice also provided compound **3a** in good yield. As shown in Figure 1, at the beginning of the

**Figure 1.** Reaction progress for the reaction of benzaldehyde and 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione in 0.3 M citric acid (left: beginning of the reaction; right: the end of the reaction).



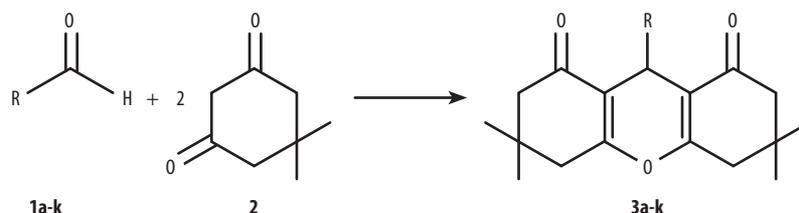
**Figure 2.** Reusability of the reaction media for the obtention of **3a**.

reaction after benzaldehyde and 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione were added to aqueous citric acid (2 mL, 0.3M), a two-phase heterogeneous system was formed (Figure 1 left). After this, within the reaction progress, the formation of a white solid was observed. This precipitate product (Figure 1 right) could be easily filtrated and washed with water and aqueous ethanol. The same phenomenon was observed when the other aqueous naturally occurring organic acids and lemon juice were used.

To study the reusability of the acidic media, we performed the same experiment described above by using lemon juice and 0.3 M citric acid (highest yields found, Table 1). After the reaction was completed the mixture was cooled to room temperature and the product was isolated by filtration. The recovered citric acid aqueous solution and lemon juice were reused as acidic media for three additional reactions to obtain the compound **3a**. These experiments showed small decreases in the yield of **3a**, which evidence the high reusability of this reaction media (Figure 2).

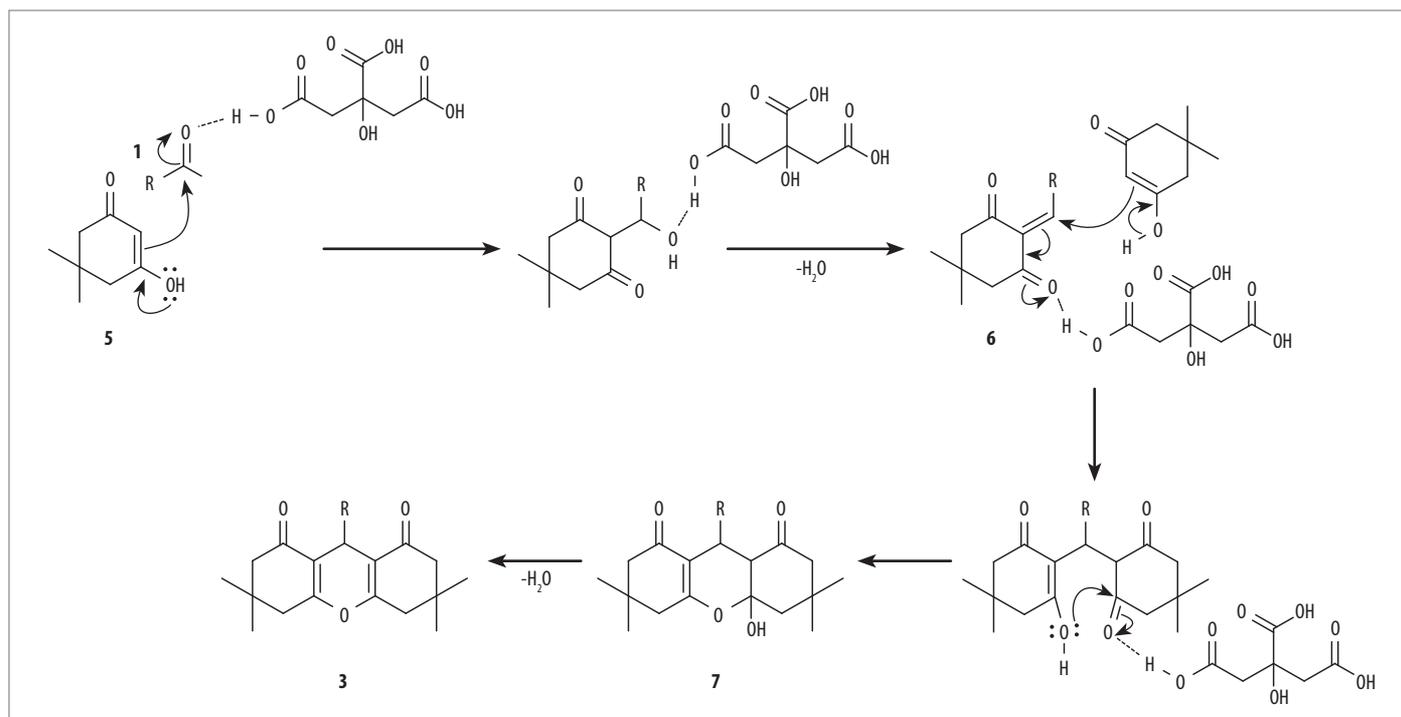
Additionally, using the best experimental conditions to perform the xanthene synthesis, indicated in entries 11 and 13 of Table 1, we examine the scope and generality of the citric acid and lemon juice-mediated synthesis by employing various aromatic aldehydes (Table 2). First, the reaction was carried out by using a series of different aldehydes, 5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione and lemon juice as solvent (Table 2, entries 2, 6, and 8). Although lemon juice was proved to be capable of promoting the reaction with benzaldehyde, it was found that when both electron-rich and electron-deficient aromatic aldehydes were used, the reaction was not completed and a mixture of the desired xanthene and tetraketone was obtained in low yields, together with starting materials (Table 2, entries 2, 6, and 8). Increasing the reaction time and temperature did not improve the yield of xanthenes and the lemon juice turned brown probably due to the decompositions of some components present in it. However, when the reaction was conducted in 0.3 M citric acid the xanthene derivatives **3b**, **3f** and **3h** were obtained in good yields (Table 2, entries 2, 6, and 8). Following the same procedure, both electron-rich (Table 2, entries 3-5) and electron-deficient aromatic aldehydes (Table 2, entries 7 and 9) as well as heteroaromatic aldehydes (Table 2, entries 10 and 11) were converted into desired products in moderate to good

**Table 2.** One-pot reaction of dimedone **2** and different aromatic aldehydes **1a-k**<sup>a</sup>.



Entry	Aldehyde	Product	Yield <sup>b</sup>		Mp [ref.] °C
			Lemon juice	0.3 M citric acid	
1	Benzaldehyde (1a)	3a	86	85	204-206 [17]
2	4-Methoxybenzaldehyde (1b)	3b	20, 5 <sup>c</sup>	78	245-248 [17]
3	4-Dimethylaminobenzaldehyde (1c)	3c	---	80	219-221 [17]
4	3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde (1d)	3d	---	83	204-207 [18]
5	Piperonal (1e)	3e	---	82	218-220 [18]
6	4-Bromobenzaldehyde (1f)	3f	22, 12 <sup>c</sup>	84	228-230 [25]
7	4-Chlorobenzaldehyde (1g)	3g	---	83	230-232 [17]
8	4-Nitrobenzaldehyde (1h)	3h	25, 10 <sup>c</sup>	85	225-227 [17]
9	2-Nitrobenzaldehyde (1i)	3i	---	78	258-261 [17]
10	2-Pyridinecarbaldehyde (1j)	3j	---	79	190-192 [18]
11	2-Thiophenecarbaldehyde (1k)	3k	---	73	163-165 [18]

<sup>a</sup> **1a-k**: 0.5 mmol, **2**: 1.0 mmol, 2.0 mL of reaction media, 6h, 90 °C. <sup>b</sup> Isolated yield. <sup>c</sup> Yield of the corresponding tetraketone obtained.



**Figure 3.** Mechanism proposed to obtain 1,8-dioxo-octahydroxanthenes **3a-k**.

yields. It is important to note here that just compounds **3i-3k** were purified by recrystallization from ethanol and the other derivatives were obtained as pure compounds after washing with water and aqueous ethanol.

A plausible mechanism for the formation of compounds **3a-k** is given in Figure 3. First, the formation of the Knoevenagel adduct **6** promoted by citric acid takes place by the reaction of the enolic form of dimedone **5** with the aromatic aldehyde. Then **6** may further undergo Michael addition with another molecule of dimedone, in its enol form, to yield intermediate **7**, which after a dehydration reaction gives compounds **3**.

## Conclusions

We described a simple, practical, economically viable and environmentally benign one-pot method for the synthesis of 9-aryl-1,8-dioxo-octahydroxanthenes. All reactions were performed in aqueous citric acid under mild conditions and using aromatic aldehydes containing both electro-donating and electron-withdrawing groups yielding the desired compounds in good yields.

Compared with the previously reported methods, our green protocol has the following advantages: mild reaction conditions, all products could be easily isolated by filtration avoiding the use of toxic organic solvents for the workup and thus minimizing waste, easy purification by recrystallization in ethanol when required (bypassing the need for costly column chromatography), reusability of the reaction media and the use of low-cost and readily available citric acid to promote the reaction.

## Acknowledgements

The authors are thankful to the Universidad Nacional de Colombia for the support of this work.

## References

- Casillas, L.K.; Townsend, C.A. Total Synthesis of O-Methylsterigmatocystin Using N-Alkyltrilium Salts and Carbonyl-Alkene Interconversion in a New Xanthone Synthesis. *J. Org. Chem.* 1999. **64**: 4050-4059.
- Pietre, A.; Chevenier, E.; Massardier, C.; Gimbert, Y.; Greene, A.E. Synthetic Approach to Hypoxyxylone, Novel Inhibitor of Topoisomerase I. *Org. Lett.* 2002. **4**: 3139-3142.
- Suzuki, Y.; Fukuta, Y.; Ota, S.; Kamiya, M.; Sato, M. Xanthone Natural Products via N-Heterocyclic Carbene Catalysis: Total Synthesis of Atroviridin. *J. Org. Chem.* 2011. **76**: 3960-3967.
- Eguchi, T.; Kondo, K.; Kakinuma, K.; Uekusa, H.; Ohashi, Y.; Mizoue, K.; Qiao, Y.-F. Unique Solvent-Dependent Atropisomerism of a Novel Cytotoxic Naphthoxanthene Antibiotic FD-594. *J. Org. Chem.* 1999. **64**: 5371-5376.
- Konno, F.; Ishikawa, T.; Kawahata, M.; Yamaguchi, K. Concise Synthesis of Arnottin I and (-)-Arnottin II. *J. Org. Chem.* 2006. **71**: 9818-9823.
- Rarig, R.-A.F.; Tran, M.N.; Chenoweth, D.M. Synthesis and Conformational Dynamics of the Reported Structure of Xylopyridine A. *J. Am. Chem. Soc.* 2013. **135**: 9213-9219.
- Lambert, R.W.; Martin, J.A.; Merrett, J.H.; Parkes, K.E.B.; Thomas, G.J. Pyrimidine nucleosides PCT. *Int. Appl. WO 9706178*, 1997.
- Hideo, T.; Teruomi, J. 1-Benzopyrano[2,3-b]xanthene derivative and its preparation. *Jpn. Pat.* 56005480, 1981.
- Poupelin, J.P.; Saint-Ruf, G.; Foussard-Blanpin, O.; Narcisse, G.; Uchida-Ernouf, G.; Lacroix, R. Synthesis and antiinflammatory properties of bis(2-hydroxy-1-naphthyl)methane derivatives. I. Monosubstituted derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 1978. **13**: 67-71.
- Callan, J.F.; Silva, A.P.d.; Magri, D.C. Luminescent sensors and switches in the early 21st century. *Tetrahedron.* 2005. **61**: 8551-8588.
- Hamblin, M.R.; Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004. **3**: 436-450.

12. Renno, R. Z.; Miller, J. K. Photosensitizer delivery for photodynamic therapy of choroidal neovascularization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. **52**: 63-78.
13. Banerjee, A.; Mukherjee, A. K. Chemical Aspects of Santalin as a Histological Stain. *Biotech. Histochem.* 1981. **56**: 83-85.
14. Knight, C.G.; Stephens, T. Xanthene-dye-labelled phosphatidylethanolamines as probes of interfacial pH. Studies in phospholipid vesicles. *Biochem. J.* 1989. **258**: 683-687.
15. Ahmad, M.; King, T. A.; Ko, D. K.; Cha, B. H.; Lee, J. Performance and photostability of xanthene and pyrromethene laser dyes in sol-gel phases. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2002. **35**: 1473-1476.
16. He, F.; Li, P.; Gu, Y.; Li, G. Glycerol as a promoting medium for electrophilic activation of aldehydes: catalyst-free synthesis of di(indolyl)methanes, xanthene-1,8(2H)-diones and 1-oxo-hexahydroxanthenes. *Green Chem.* 2009. **11**: 1767-1773.
17. Kantevari, S.; Bantu, R.; Nagarapu, L.  $\text{HClO}_4$ - $\text{SiO}_2$  and PPA- $\text{SiO}_2$  catalyzed efficient one-pot Knoevenagel condensation, Michael addition and cyclo-dehydration of dimedone and aldehydes in acetonitrile, aqueous and solvent free conditions: Scope and limitations. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 2007. **269**: 53-57.
18. Lü, H. Y.; Li, J. J.; Zhang, Z.-H.  $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ : a highly efficient catalyst for the synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthene derivatives under solvent-free conditions. *Appl. Organometal. Chem.* 2009. **23**: 165-169.
19. Shakibaei, G. I.; Mirzaei, P.; Bazgir, A. Dowex-50W promoted synthesis of 14-aryl-14H-dibenzo[a,j]xanthene and 1,8-dioxo-octahydroxanthene derivatives under solvent-free conditions. *Appl. Catal., A: Gen.* 2007. **325**: 188-192.
20. Verma, G. K.; Raghuvanshi, K.; Verma, R. K.; Dwivedi, P.; Singh, M.S. An efficient one-pot solvent-free synthesis and photophysical properties of 9-aryl/alkyl-octahydroxanthene-1,8-diones. *Tetrahedron.* 2011. **67**: 3698-3704.
21. Shirini, F.; Khaligh, N. G. Succinimide-N-sulfonic acid: An efficient catalyst for the synthesis of xanthene derivatives under solvent-free conditions. *Dyes Pigm.* 2012. **95**: 789-794.
22. Maleki, B.; Gholizadeh, M.; Sepehr, Z. 1,3,5-Trichloro-2,4,6-Triazinetrion: A Versatile Heterocycle for the One-Pot Synthesis of 14-Aryl- or Alkyl -14H-Dibenzo[a,j]xanthene, 1,8-Dioxooctahydroxanthene and 12-Aryl-8,9,10,12-Tetrahydrobenzo[a]xanthene-11-one Derivatives under Solvent-Free Conditions. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2011. **32**: 1697-1702.
23. Zolfigol, M. A.; Khakyzadeh, V.; Moosavi-Zare, A. R.; Zare, A.; Azimi, S. B.; Asgari, Z.; Hasaninejad, A. Preparation of various xanthene derivatives over sulfonic acid functionalized imidazolium salts (SAFIS) as novel, highly efficient and reusable catalysts. *C. R. Chim.* 2012. **15**: 719-736.
24. Dabiri, M.; Baghbanzadeh, M.; Arzroomchilar, S. 1-methylimidazolium trifluoroacetate ([Hmim]<sup>+</sup>TFA<sup>-</sup>): An efficient reusable acidic ionic liquid for the synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes and 1,8-dioxo-decahydroacridines. *Catal. Commun.* 2008. **9**: 939-942.
25. Fang, D.; Gong, K.; Liu, Z.-L. Synthesis of 1,8-Dioxo-octahydroxanthenes Catalyzed by Acidic Ionic Liquids in Aqueous Media. *Catal. Lett.* 2009. **127**: 291-295.
26. Rad-Moghadam, K.; Azimi, S. C.  $\text{Mg}(\text{BF}_4)_2$  doped in [BMIm]<sup>+</sup>[BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]: A homogeneous ionic liquid-catalyst for efficient synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes, decahydroacridines and 14-aryl-14H-dibenzo[a,j]xanthenes. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 2012. **363-364**: 465-469.
27. Zare, A.; Moosavi-Zare, A. R.; Merajoddin, M.; Zolfigol, M. A.; Hekmat-Zadeh, T.; Hasaninejad, A.; Khazaei, A.; Mokhlesi, M.; Khakyzadeh, V.; Derakhshan-Panah, F.; Beyzavi, M. H.; Rostami, E.; Arghoon, A.; Roohandeh, R. Ionic liquid triethylamine-bonded sulfonic acid  $\{[\text{Et}_3\text{N}-\text{SO}_3\text{H}]\text{Cl}\}$  as a novel, highly efficient and homogeneous catalyst for the synthesis of  $\beta$ -acetamido ketones, 1,8-dioxo-octahydroxanthenes and 14-aryl-14H-dibenzo[a,j]xanthenes. *J. Mol. Liq.* 2012. **167**: 69-77.
28. Bigdeli, M. Clean synthesis of 1,8-dioxooctahydroxanthenes promoted by DABCO-bromine in aqueous media. *Chin. Chem. Lett.* 2010. **21**: 1180-1182.
29. Darviche, F.; Balalaie, S.; Chadegani, F. Diammonium Hydrogen Phosphate as a Neutral and Efficient Catalyst for Synthesis of 1,8-Dioxo-octahydroxanthene Derivatives in Aqueous Media. *Synth. Commun.* 2007. **37**: 1059-1066.
30. Kamble, S.; Rashinkar, G.; Kumbhar, A.; Salunkhe, R. Hydrotrope induced synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes in aqueous medium. *Green Chem. Lett. Rev.* 2012. **5**: 101-107.
31. Das, B.; Thirupathi, P.; Reddy, K. R.; Ravikanth, B.; Nagarapu, L. An efficient synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes using heterogeneous catalysts. *Catal. Commun.* 2007. **8**: 535-538.
32. Javid, A.; Heravi, M. M.; Bamoharram, F. F. One-Pot Synthesis of 1,8-Dioxo-octahydroxanthenes Utilizing Silica-Supported Preyssler Nano Particles as Novel and Efficient Reusable Heterogeneous Acidic Catalyst. *E-J. Chem.* 2011. **8**: 910-916.
33. Niknam, K.; Panahi, F.; Saberi, D.; Mohagheghnejad, M. Silica-Bonded S-Sulfonic Acid as Recyclable Catalyst for the Synthesis of 1,8-Dioxo-decahydroacridines and 1,8-Dioxo-octahydroxanthenes. *J. Heterocyclic Chem.* 2010. **47**: 292-300.
34. Oskooie, H. A.; Tahershamsi, L.; Heravi, M.; Baghernejad, B. Cellulose Sulfonic Acid: An Efficient Heterogeneous Catalyst for the Synthesis of 1, 8-Dioxo-octahydroxanthenes. *E-J. Chem.* 2010. **7**: 717-720.
35. Pramanik, A.; Bhar, S. Alumina-sulfuric acid catalyzed eco-friendly synthesis of xanthenediones. *Catal. Commun.* 2012. **20**: 17-24.
36. Das, P.; Dutta, A.; Bhaumik, A.; Mukhopadhyay, C. Heterogeneous ditopic  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  catalyzed synthesis of 4H-pyrans: further conversion to 1,4-DHPs and report of functional group interconversion from amide to ester. *Green Chem.* 2014. **14**: 1426-1435.
37. Shaterian, H.; Rigi, F. An efficient synthesis of quinazoline and xanthene derivatives using starch sulfate as a biodegradable solid acid catalyst. *Res. Chem. Intermed.* 2013. **1**-18.
38. Khazaei, A.; Moosavi-Zare, A. R.; Mohammadi, Z.; Zare, A.; Khakyzadeh, V.; Darvishi, G. Efficient preparation of 9-aryl-1,8-dioxo-octahydroxanthenes catalyzed by nano- $\text{TiO}_2$  with high recyclability. *RSC Adv.* 2013. **3**: 1323-1326.
39. Tu, S.; Gao, Y.; Miao, C.; Zhu, S.; Li, T.; Zhang, X.; Shi, D. The Reaction of Aromatic Dialdehyde with Dimedone Under Microwave Irradiation. *Synth. Commun.* 2004. **34**: 2617-2622.
40. Dadhania, A. N.; Patel, V. K.; Raval, D. K. Catalyst-free sonochemical synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthene derivatives in carboxy functionalized ionic liquid. *C. R. Chim.* 2012. **15**: 378-383.
41. Jin, T. S.; Zhang, J. S.; Wang, A. Q.; Li, T. S. Ultrasound-assisted synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthene derivatives catalyzed by p-dodecylbenzenesulfonic acid in aqueous media. *Ultrason. Sonochem.* 2006. **13**: 220-224.
42. Rostamizadeh, S.; Amani, A. M.; Mahdavinia, G. H.; Amiri, G.; Sepehrian, H. Ultrasound promoted rapid and green synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes derivatives using nanosized MCM-41- $\text{SO}_3\text{H}$  as a nanoreactor, nanocatalyst in aqueous media. *Ultrason. Sonochem.* 2010. **17**: 306-309.
43. Venkatesan, K.; Pujari, S. S.; Lahoti, R.J.; Srinivasan, K. V. An efficient synthesis of 1,8-dioxo-octahydro-xanthene derivatives promoted by a room temperature ionic liquid at ambient conditions under ultrasound irradiation. *Ultrason. Sonochem.* 2008. **15**: 548-553.
44. Mulakayala, N.; Pavan Kumar, G.; Rambabu, D.; Aeluri, M.; Baveswara Rao, M. V.; Pal, M. A greener synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthene derivatives under ultrasound *Tetrahedron Lett* 2012. **53**: 6923-6926.

45. Berovic, M.; Legisa, M., Citric acid production, in: *Biotechnology Annual Review*, M.R. El-Gewely (Ed.) Amsterdam, Elsevier, pp. 303-343, 2007.
46. Belitz, H.-D.; Grosch, W. *Food Chemistry*, Second edition ed., Heidelberg, Springer-Verlag, 1999.
47. Kristiansen, B.; Matthey, M.; Linden, J. *Citric Acid Biotechnology*, London, Taylor & Francis Ltd, 2002.
48. Rohokale, S.; Kote, S.; Deshmukh, S.; Thopate, S. Natural organic acids promoted Beckmann rearrangement: Green and expeditious synthesis of amides under solvent-free conditions. *Chem. Pap.* 2014. **68**: 575-578.
49. Thopate, S.R.; Kote, S.R.; Rohokale, S.V.; Thorat, N.M. Citric acid catalysed Beckmann rearrangement, under solvent free conditions. *J. Chem. Res.* 2011. **35**: 124-125.
50. Vasconcelos, A. D.; Oliveira, P. S. Ritter, M.; Freitag, R. A.; Romano, R. L.; Quina, F. H.; Pizzuti, L.; Pereira, C. M. P.; Stefanello, F. M.; Barschak, A.G. Antioxidant Capacity and Environmentally Friendly Synthesis of Dihydropyrimidin-(2H)-ones Promoted by Naturally Occurring Organic Acids. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2012. **26**: 155-161.
51. Ghorbani-Choghamarani, A.; Taghipour, T. Green and One-Pot Three-Component Synthesis of 2,3-Dihydroquinazolin-4(1H)-Ones Promoted by Citric Acid as Recoverable Catalyst in Water. *Lett. Org. Chem.* 2011. **8**: 470-476.
52. Enugala, R.; Nuvvula, S.; Kotra, V.; Varala, R.; Adapa, S. R. Green Approach for the Efficient Synthesis of Quinolines Promoted by Citric Acid. *Heterocycles* 2008. **75**: 2523-2533.
53. Martínez Gómez, S. M.; Alzate Sánchez, D.M.; Rodríguez-Córdoba, W.; Sierra, C. A.; Ochoa-Puentes, C. Competitive One-Pot Reactions: Simultaneous Synthesis of Decahydroacridine-1,8-diones and 1,8-Dioxo-octahydroxanthenes and Photophysical Characterization. *Synth. Commun.* 2014. **44**: 648-659.
54. Rodríguez-Córdoba, W.; Sierra, C. A.; Ochoa-Puentes, C.; Lahti, P. M.; Peon, J. Photoinduced Energy Transfer in Bichromophoric Pyrene-PPV Oligomer Systems: The Role of Flexible Donor-Acceptor Bridges. *J. Phys. Chem. B* 2012. **116**: 3490-3503.
55. Yu, J. J.; Wang, L. M.; Liu, J. Q.; Guo, F. L.; Liu, Y.; Jiao, N. Synthesis of tetraketones in water and under catalyst-free conditions. *Green Chem.* 2010. **12**: 216-219.

**Article citation:**

Navarro, C. A.; Sierra, C. A.; Ochoa-Puentes, C. Aqueous citric acid as "green" reaction media for the synthesis of octahydroxanthenes. *Rev Colomb Quim.* 2013. **42**(2): 5-11.

## Producción y purificación de anticuerpos aviares (IgYs) a partir de cuerpos de inclusión de una proteína recombinante central en el metabolismo del NAD<sup>+</sup>

### Resumen

El uso de gallinas para la producción de anticuerpos policlonales reduce la manipulación animal, obteniendo además una gran cantidad de anticuerpos. Las aves presentan mayor distancia filogenética entre sus antígenos y los de mamíferos lo que ofrece altos porcentajes de anticuerpos específicos. La producción de anticuerpos requiere antígenos en cantidades considerables; por ello es creciente el uso de proteínas recombinantes para tales fines. No obstante, la obtención de proteínas en sistemas heterólogos conduce frecuentemente a la precipitación en agregados insolubles de limitada utilidad (cuerpos de inclusión). Se presenta una metodología para la producción de anticuerpos policlonales (IgYs) empleando cuerpos de inclusión (CI) como antígeno. Los CI purificados e inoculados corresponden a la Nicotinamida/Nicotinato Mononucleótido Adenililtransferasa (His-GiNMNAT) de *Giardia intestinalis* expresada en *Escherichia coli*. La purificación del antígeno se llevó a cabo mediante solubilización y renaturalización. Los anticuerpos se purificaron de la yema de huevo de gallinas inmunizadas mediante dilución en agua, seguida de precipitación con sulfato de amonio al 60% y afinidad tiofílica. Los anticuerpos fueron evaluados mediante *immunoblot* empleando la proteína His-GiNMNAT. De una yema de huevo se obtuvieron 14,4 mg de IgYs, con alta pureza y con un reconocimiento de hasta 15 ng de His-GiNMNAT. Se mejoró la especificidad de

## Production and purification of avian antibodies (IgYs) from inclusion bodies of a recombinant protein central in NAD<sup>+</sup> metabolism

### Abstract

In contrast with other animal models, the use of hens for polyclonal antibodies production not only reduces animal intervention, but also increases the quantity of the obtained immunoglobulins. The phylogenetic distance between birds and mammals, leads to more specific avian antibodies than their mammalian counterparts. Since a large amount of antigen is required for avian antibody production, the use of recombinant proteins for this procedure has been growing faster over the last years. Nevertheless, recombinant protein production through heterologous systems, frequently leads to the formation of insoluble and useless aggregates (inclusion bodies, IC). This article presents a strategy to produce avian polyclonal antibodies (IgYs) from IC. In order to obtain the antigen, the *Giardia intestinalis* nicotinamide mononucleotide adenyltransferase recombinant protein (His-GiNMNAT) was expressed in *Escherichia coli*. The His-GiNMNAT protein was purified through IC solubilization and re-folding. The purified protein was used to immunize hens. The antibodies were purified from egg yolk by water dilution, followed by ammonium sulfate precipitation and thiophilic affinity chromatography. Specificity of the purified antibodies was tested against the His-GiNMNAT protein through Western blot essays. In terms of yield, 14.4 mg of highly pure IgYs were obtained from one egg yolk; these antibodies were able to detect 15 ng of antigen. IgYs

## Produção e purificação de anticorpos aviários (IgYs) empregando os corpos de inclusão de uma proteína recombinante importante para o metabolismo do NAD<sup>+</sup>

### Resumo

A utilização de galinhas para a produção de anticorpos policlonais, diminui a intervenção sobre o animal e permite a geração de grandes quantidades de anticorpos. As aves têm maior distância filogenética entre os seus antígenos em comparação com os mamíferos, oferecendo altos porcentagens de anticorpos específicos. A produção de anticorpos requerem quantidades consideráveis de antígeno, por conseguinte, é comum a utilização de proteínas recombinantes para esta finalidade. No entanto, a produção de proteínas em sistemas heterólogos muitas vezes leva à precipitação em agregados insolúveis de utilidade limitada (corpos de inclusão).

Este trabalho apresenta uma metodologia para a produção de anticorpos policlonais, utilizando proteína recombinante a partir de corpos de inclusão. O antígeno utilizado foi a proteína Nicotinamida / Nicotinato Mononucleótido Adenililtransferasa de *Giardia intestinalis* gerada em *Escherichia coli* (His-GiNMNAT). A purificação do antígeno foi feita por solubilização e renaturalização. Os anticorpos foram purificados a partir da gema de ovo de galinhas imunizadas pelo método de diluição em água, seguido de precipitação com sulfato de amônio (60%) e afinidade tiofílica. Os anticorpos foram avaliados por *immunoblot* utilizando a proteína His-GiNMNAT. De uma gema de ovo foram obtidos 14,4 mg de IgYs com pureza elevada. Estes anticorpos podem reconhecer até 15 ng de His-GiNMNAT. A especificidade dos

los IgYs mediante una purificación adicional por afinidad al antígeno, lo cual permitiría su empleo para el reconocimiento de la proteína del parásito.

**Palabras clave:** anticuerpos, IgYs, cuerpos de inclusión (CI), *Giardia intestinalis*, NAD<sup>+</sup>, NMNAT.

specificity was improved by means of antigen affinity purification, allowing its implementation for endogenous detection of GiNMNAT protein in *G. intestinalis*.

**Keywords:** Antibodies, IgYs, inclusion bodies, *Giardia intestinalis*, NAD<sup>+</sup>, NMNAT.

IgYs foi reforçada por outra purificação por afinidade pelo antígeno. Isto irá permitir a sua utilização para o reconhecimento da proteína do parasita.

**Palavras-chave:** anticorpos, IgYs, corpos de inclusão (CI), *Giardia intestinalis*, NAD<sup>+</sup>, NMNAT.

## Introducción

LOS PROTOZOOS DEL GÉNERO *Giardia* son considerados modelos biológicos de gran interés en razón a su posición evolutiva basal, metabolismo reducido y simplicidad estructural. Son parásitos de mamíferos que constituyen un problema de salud pública, humana y veterinaria a nivel mundial (1). *Giardia intestinalis* es un eucariota ancestral con vías metabólicas simplificadas, similares a las procariotas, muchas de las cuales permanecen sin ser dilucidadas.

El Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD<sup>+</sup>) en sus diversas formas (NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup>, NADPH<sup>+</sup>) tiene un rol fundamental como cofactor de óxido-reductasas, tanto en reacciones catabólicas, como en procesos anabólicos (2-4). Adicionalmente, en la última década se ha acumulado evidencia sobre el papel del NAD<sup>+</sup> como sustrato para la modificación covalente de proteínas y la generación de movilizadores de calcio (3, 5, 6).

Teniendo en cuenta la multifuncionalidad del NAD<sup>+</sup>, muchos procesos celulares son regulados mediante las rutas de síntesis y consumo de esta molécula, siendo su síntesis indispensable para la viabilidad celular (7,8). En organismos como *Giardia*, el estudio de este tipo de vías centrales es un punto clave para evaluar la divergencia de la maquinaria celular ya que al estudiar el metabolismo energético en organismos basales, se puede tener una mejor comprensión de estos procesos en organismos más complejos (9).

El transcriptoma de *Giardia intestinalis* reporta dos secuencias candidatas para la Nicotinamida / Nicotinato Mononucleótido Adenilil-transferasa (GiNMNAT), enzima central en la síntesis del NAD<sup>+</sup>, ya que constituye el punto de convergencia entre las vías de síntesis conocidas para esta molécula (10). En trabajos realizados previamente, ambas secuencias fueron evaluadas en sistemas heterólogos mediante el uso de proteínas recombinantes, obteniéndose la primera evidencia de la expresión a nivel proteico de ambas isoenzimas; ensayos adicionales han permitido confirmar ambos candidatos como enzimas activas *in vitro* (11-13).

La producción de proteínas recombinantes conduce frecuentemente a la formación de cuerpos de inclusión que se definen como agregados insolubles compuestos casi exclusivamente por proteína recombinante en diferentes estados de plegamiento (14). Los cuerpos de inclusión se consideran un efecto no deseado en ensayos funcionales debido a la pérdida de la estructura nativa; algunas veces, las proteínas pueden ser recuperadas a través de solubilización en agentes denaturantes, seguida de renaturalización. A pesar de la pérdida de la estructura tridimensional, la estructura primaria no se ve alterada y esto permite su empleo como un excelente antígeno para el desarrollo de anticuerpos.

En el presente trabajo se realizó la producción de anticuerpos policlonales contra una de las isoenzimas de *Giardia intestinalis* empleando modelos aviares. Los anticuerpos policlonales constituyen herramientas de gran interés en la investigación científica; por tanto, hoy en día se hace más exigente, no sólo su calidad, sino también la metodología empleada para su producción. Tanto en la sangre como en la yema de huevo de las aves se acumula una inmunoglobulina G homóloga, conocida como IgY. Estas inmunoglobulinas son transferidas desde el sistema cir-

culatorio de la gallina a través del oolema hacia el ovocito en desarrollo en el folículo ovárico. Se producen entre 70 y 100 mg de IgY de acuerdo al tamaño del huevo, siendo una fuente abundante de anticuerpos policlonales que pueden ser adquiridos a partir de huevos obtenidos de gallinas inmunizadas sin involucrar la muerte del animal (15-20). En este trabajo se presenta la obtención, purificación y caracterización de anticuerpos IgY contra una de las isoenzimas GiNMNAT obtenida a partir de cuerpos de inclusión.

## Materiales y métodos

### Obtención del antígeno

La proteína recombinante His-GiNMNAT se obtuvo a partir del clon de expresión BL21 (DE3) – transformado con el vector pET100D-TOPO/*ginmnat*; un pre-inóculo de las células creció a 37 °C durante toda la noche en medio Luria Bertani (AMRESCO®) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina (Genfar®). Posteriormente se realizó una dilución 1/100 del pre-inóculo en medio Luria Bertani (AMRESCO®) y se llevó a cabo la inducción a la OD<sub>600</sub> ≈ 0,6 empleando Isopropil-tio-glactopiranosido (IPTG) (Fermentas®) a una concentración final de 1mM, de acuerdo a condiciones experimentales estandarizadas previamente (11-12, 15). Las células fueron colectadas por centrifugación a 6000 rpm durante 10 min; los lisados se obtuvieron mediante el tratamiento de las células con lisozima (1 µg/ml) y la maceración de los mismos se realizó bajo nitrógeno líquido. La separación de fracciones proteicas solubles e insolubles (cuerpos de inclusión, CI) se llevó a cabo mediante centrifugación de los lisados celulares obtenidos a 12000 rpm por 30 min.

La purificación de la proteína se realizó mediante homogeneización de la fracción insoluble en solución de lavado 1 (urea 2M, Tris/HCl 100 mM pH 7, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, Tritón X-100 2% p/v) Tritón X-100) y posterior centrifugación a 12000 rpm durante 30 min a 4 °C. Para retirar el exceso de urea y detergente, el precipitado resultante se homogeneizó en una solución de lavado 2 (Tris/HCl 100 mM pH 7, EDTA 5 mM, DTT 5 mM). El precipitado obtenido se homogeneizó en buffer de re-suspensión (hidrocloruro de guanidina 8 M, tris/HCl 50 mM pH 7, EDTA 5 mM, DTT 5 mM) y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 hora (h) a 4 °C; de allí se separaron las fracciones solubilizadas de las insolubles (16). Las fracciones solubilizadas se sometieron a un proceso de diálisis. Las muestras obtenidas durante el proceso de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE.

### Cuantificación de proteínas

Se determinó la cantidad de proteína antigénica total mediante un método semi-cuantitativo (densitometría en gel). Se tomaron diferentes volúmenes (5, 10 y 15 µl) de la proteína antígeno (His-GiNMNAT) y se prepararon para SDS PAGE 12%. La tinción de las bandas obtenidas

**Tabla 1.** Esquema de inoculación de las gallinas para la obtención de los anticuerpos aviares.

Día	His-GNMNAT			Control		
	0	30	60	0	30	60
Adyuvante	Completo 150 µl	Incompleto 150 µl	Incompleto 150 µl	Completo 150 µl	Incompleto 150 µl	Incompleto 150 µl
Antígeno (µg)	150	150	150	---	---	---
Volumen inyectado (µl)	~300 µl	~300 µl	~300 µl	~300 µl	~300 µl	~300 µl

se realizó con azul de Coomassie 0,1% R-250. Los valores de área e intensidad de las bandas de interés en el gel obtenido se midieron en el densitómetro de análisis molecular (BioRad) empleando el software IMAGEJ (18). Estos valores fueron interpolados de la curva estándar realizada con 0,5, 2 y 4 µg de BSA (Suero de Albúmina Bovina, Sigma, MO, USA).

Los anticuerpos aviares (IgY) se sometieron a cuantificación de proteína total por el método de Bradford, empleando BSA en diferentes concentraciones como patrón para la curva de calibración espectrofotométrica.

### Producción de anticuerpos policlonales

#### Esquema de inmunización aviar y recolección de huevos

Se emplearon gallinas Babcock Brown de 19 semanas de edad (tres por tratamiento). Se realizaron inoculaciones intramusculares con antígeno His-GiNMNAT y un control sin antígeno (Tabla 1). Se recogieron 72 huevos de cada gallina. Adicionalmente, para analizar los IgY plasmáticos, al cabo de un mes de inoculación se tomaron muestras de sangre de las aves.

### Purificación de los anticuerpos obtenidos

#### Deslipidación de las yemas de los huevos recolectados

Se empleó el método descrito por Akita y Nakai (19); se extrajo la yema retirando la clara y se solubilizó en 9 volúmenes de agua destilada; el pH de la solución se equilibró en 5,0. Se sometió la solución a 16 h de agitación a 4 °C y se centrifugó a 8000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se conservó a -80 °C. 2 ml del sobrenadante se sometieron a precipitación con sulfato de amonio (60%). El precipitado se solubilizó en 2 ml de PBS para posteriormente realizar análisis de ELISA y determinar las yemas con mayor contenido de IgYs.

#### Cromatografía tiofilica

A partir de los huevos que contenían la mayor cantidad de IgY, se realizó la purificación de los mismos mediante métodos de afinidad (1). Se adicionaron 87 mg de sulfato de sodio por cada mililitro de solución a la muestra. Se dializó a 4 °C toda la noche, se centrifugó dos veces a 10000 x g durante 30 min, se filtró tres veces utilizando membranas de 0,45 µm. Se utilizó el kit Pierce® Thiophilic Adsorbent, equilibrando la columna con 24 ml de buffer de unión (sulfato de potasio 0,5 M, fosfato de sodio 50 mM, azida de sodio 0,05%, pH 8,0). A continuación se aplicó la muestra y se recogieron fracciones de 2 ml monitorizadas a 280 nm, eliminando las proteínas no unidas mediante lavados con el buffer de unión. Las inmunoglobulinas se eluyeron, utilizando 24 ml de buffer de elución (fosfato de sodio 50 mM, azida de sodio 0,05%, pH 8,0).

Las fracciones obtenidas mediante ELISA y las IgYs eluidas se almacenaron con glicerol 10% (V/V) a 4 °C (20). El procedimiento completo de purificación de IgY se visualiza mediante SDS-PAGE al 12%.

#### Obtención de IgYs a partir de sangre de gallina

La sangre obtenida de la vena alar de las aves experimentales fue incubada a 37 °C 30 min y posteriormente centrifugada. El suero resultante fue suplementado con glicerol al 10% (v/v). Las muestras se conservaron a -20 °C para posteriores ensayos.

#### Purificación de anticuerpos IgY-αGiNMNAT por afinidad al antígeno

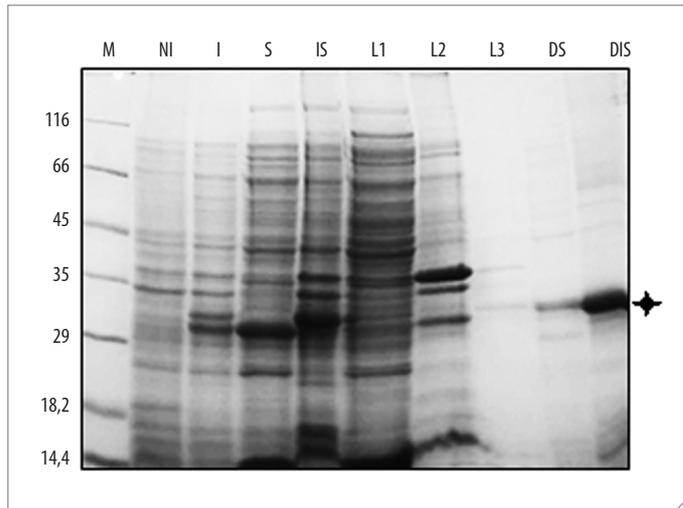
1 mg de la proteína recombinante antigénica fue cargada en SDS-PAGE al 12% y transferida a una membrana de nitrocelulosa. La banda correspondiente a la His-GiNMNAT (31 kDa.) fue evidenciada mediante tinción con solución de Ponceau S. (Sigma) y fue cortada y pre tratada con una solución de glicina 100 mM pH 2,5 por 10 min. Posteriormente fue lavada durante 5 min con 100 µl de amortiguador Tris salino (TBS) (50 mM de Tris, 150 mM NaCl); luego las membranas fueron bloqueadas con TBS suplementando leche descremada al 5%, durante 1 h a temperatura ambiente y lavadas tres veces con TBS. Posteriormente las membranas fueron sumergidas en una alícuota de 100 µl del anticuerpo puro durante 18 horas a 4 °C bajo agitación. El anticuerpo IgY-αGiNMNAT purificado se eluyó al incubar la membrana con 100 µl de una solución de glicina 100 mM pH 2,5 durante dos minutos. Seguidamente, el anticuerpo eluido se neutralizó de la solución adicionando 10 µl de Tris HCl 2M pH 8,5. La elución se repitió tres veces y se obtuvo un volumen final de 300 µl llegando a una concentración final de 150 mM Tris HCL. Los anticuerpos IgY-αGiNMNAT puros y eluidos se cuantificaron mediante un ensayo de Bradford (15).

### Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se realizaron ELISAs indirectos según procedimientos estándar (20,21). Se emplearon placas de 96 pozos activadas con 10 ng de la proteína recombinante His-GiNMNAT; las IgYs a evaluar fueron empleadas en dilución 1:100 en PBS. Como anticuerpo secundario se empleó IgG de burro anti IgY acoplado a peroxidasa (dilución 1:100000, Sigma Aldrich), utilizando como sustrato o-fenildiamina dihidrocloridrato (OPD) (Thermo Scientific) a una concentración de 0,4 mg/ml. Luego de 30 min de reacción, las placas se midieron a una densidad óptica de 490 nm para evidenciar la reacción colorimétrica producida por el sustrato OPD.

### Inmunodetección mediante *immunoblot*

Con el objeto de evaluar los anticuerpos obtenidos, se realizaron ensayos de reconocimiento sobre proteína recombinante en membranas de nitrocelulosa (Thermo Scientific). Para ello, se sembraron diferentes concentraciones del antígeno en geles discontinuos SDS-PAGE al 12%, seguido del proceso de electrotransferencia y bloqueo de inespecificidades con TBS leche descremada al 5%. El reconocimiento se llevó a cabo mediante inmunodetección empleando las IgYs obtenidas como anticuerpo prima-



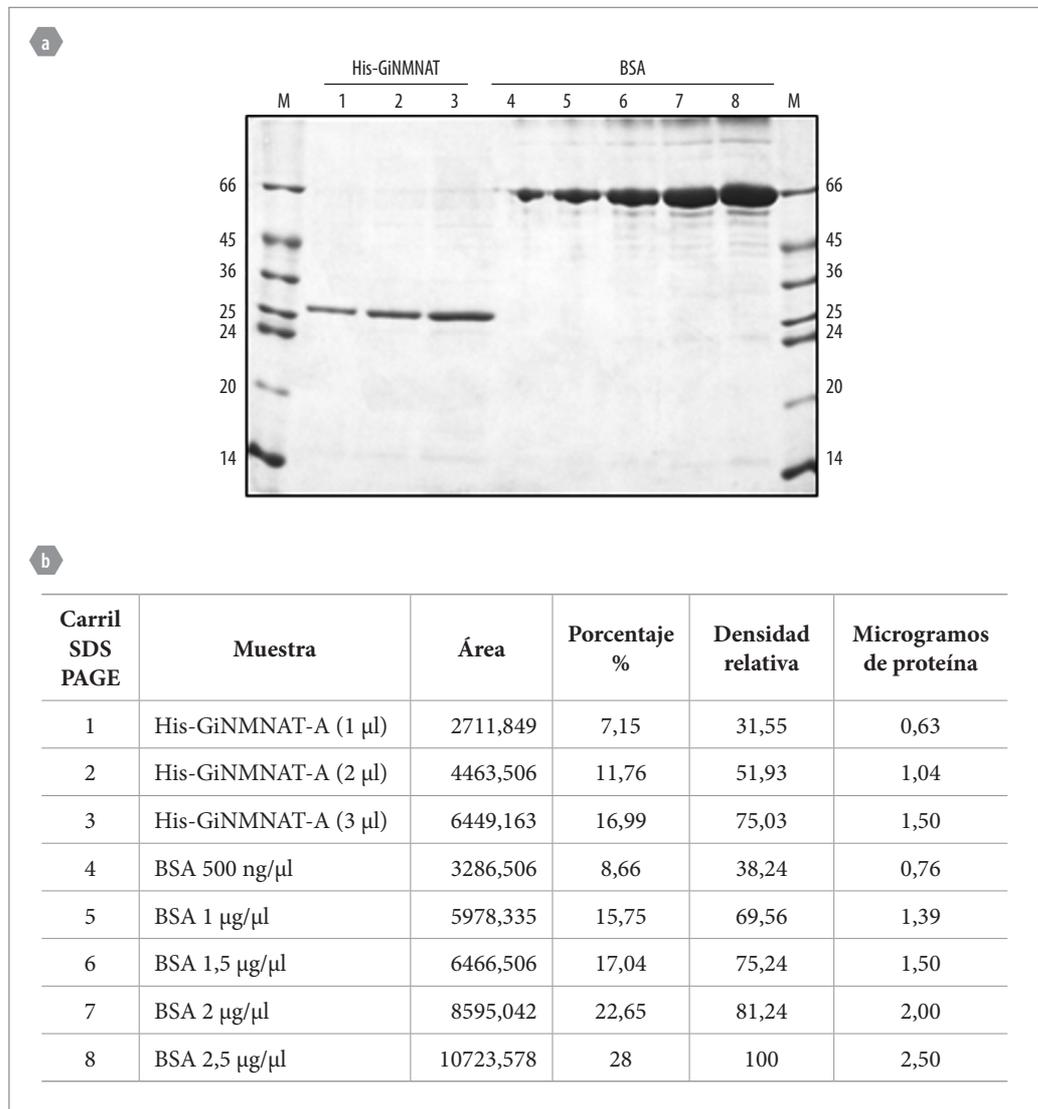
**Figura 1.** Expresión y purificación del antígeno (His-GiNMNAT) a partir de los cuerpos de inclusión de *E. coli* BL21. M: marcador de bajo peso molecular (kDa); NI: bacterias no inducidas; I: bacterias inducidas; S: fracción soluble; IS: fracción insoluble (cuerpos de inclusión); L1: primer lavado; L2: segundo lavado; L3: tercer lavado; DS: fracción soluble diálisis; DIS: fracción insoluble diálisis. SDS PAGE 12% teñido en Coomassie R-250 His-GiNMNAT.

rio; como anticuerpo secundario se utilizó IgG de burro anti IgY (Sigma) mediante el sistema de revelado de peroxidasa de rábano con los sustratos cloronaftol y peróxido al 4% según lo reportado (19).

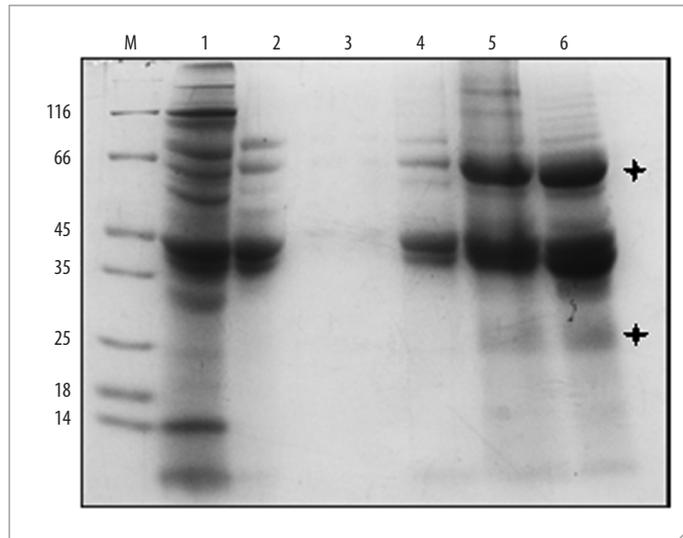
## Resultados y discusión

Como primer paso para la generación de anticuerpos policlonales es indispensable tener una gran cantidad de antígeno con un alto grado de pureza. En trabajos previos se determinó que la mayor cantidad de proteína recombinante His-GiNMNAT, expresada en *Escherichia coli*, se acumula en los cuerpos de inclusión (12, 13). Obtener proteínas en forma de cuerpos de inclusión es desventajoso para el estudio biológico de las mismas; sin embargo, estos resultan bastante útiles para la obtención de altas cantidades de proteína, uno de los requisitos que deben tener los antígenos a ser inoculados para la producción de anticuerpos en cualquier sistema por lo que se escogió esta fracción como fuente del antígeno (14).

La purificación de la proteína se llevó a cabo en tres pasos básicos: lavado, solubilización y renaturalización (13, 15). El curso de la purificación se pudo visualizar mediante SDS PAGE (Figura 1). Se obtuvo una purificación parcial de la proteína (Figura 1 DIS), la cual en su mayoría se encuentra en la fracción insoluble de la purificación, teniendo en



**Figura 2.** Cuantificación por densitometría en gel SDS PAGE de la proteína His-GiNMNAT purificada. **a.** Gel SDS PAGE 12%: M: marcador de bajo peso molecular (kDa); 1: GiNMNAT (0,125 µl); 2: GiNMNAT (0,25 µl); 3: por densitometría GiNMNAT (0,5 µl); 4: BSA (2 µg/µl); 5: BSA (4 µg/µl); 6: BSA (6 µg/µl); 7: BSA (8 µg/µl); 8: BSA (10 µg/µl) teñido en Coomassie R. **b.** Tabla de datos densitométricos (18).



**Figura 3.** Electroforesis de la deslipidación de la yema. M: marcador de bajo peso molecular (kDa); 1: proteínas totales de la yema; 2: proteínas hidrosolubles de la yema; 3: sobrenadante luego de la precipitación con sulfato de amonio; 4: precipitado con sulfato de amonio; 5: proteínas precipitadas solubilizadas en PBS; 6: proteínas finales luego de la diálisis en PBS diluido 100 veces. SDS PAGE 12%. Azul de Coomassie. \* Cadenas pesada y liviana de las IgYs.

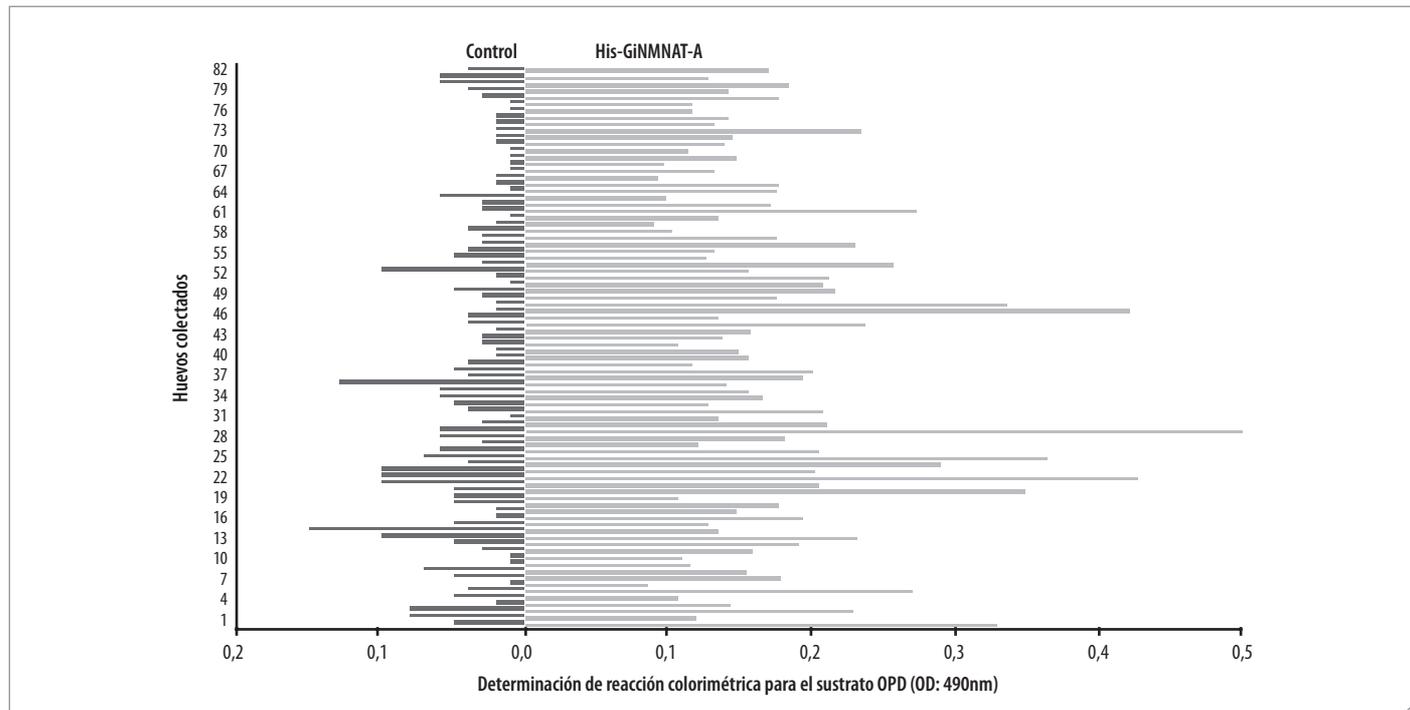
cuenta lo anterior se cuantifico a través de densitometría en gel como se describió previamente, obteniéndose 1,26 mg de His-GiNMNAT a una concentración 630 ng/μl (Figura 2).

Los anticuerpos IgY de las gallinas son transferidos desde el suero durante la maduración de la yema en el oviducto por un mecanismo similar a la transferencia placentaria que ocurre en mamíferos; allí se almacenan en grandes proporciones como un mecanismo de protección al embrión

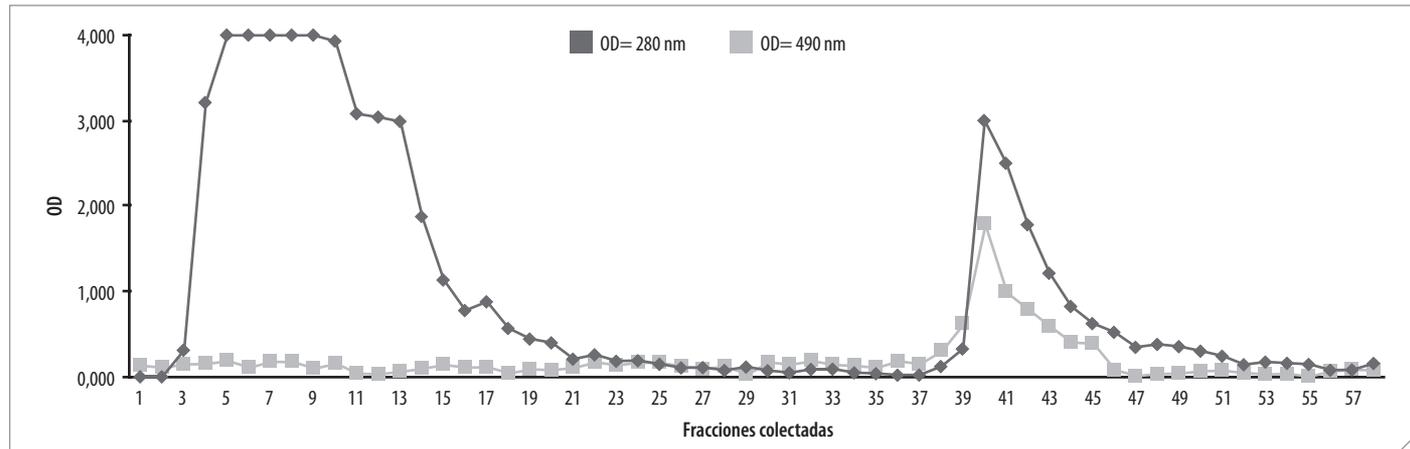
(14, 16). Ya que es posible mantener IgY activos en la yema de huevo por varios meses si se sigue una inmunización periódica se recolectaron la mayor cantidad de huevos posibles durante dos meses (24).

La yema de huevo se compone fundamentalmente de gránulos formados por fosfovitinas y lipoproteínas, dispersas en una fracción soluble que contiene livetinas y LDL (23-25). Inicialmente la separación por solubilidad, mediante dilución en agua de la yema a pH 5,0, facilitó la aglomeración de los gránulos lipídicos insolubles (deslipidación) (25), favoreciendo su posterior separación de las proteínas del plasma, entre ellas las livetinas (de 45 kDa dentro de las cuales se encuentran las IgYs) mediante centrifugación o filtración (26); ello permitió la aparición de sobrenadantes traslúcidos. Puesto que las IgYs son proteínas solubles, es posible recurrir a la precipitación por *salting out*; en este caso la adición de sulfato de amonio a una saturación del 60% ha mostrado ser óptima para la separación de las globulinas, favoreciendo un alto porcentaje de recuperación ( $\approx 89\%$ ) (Figura 3) (4, 16).

El proceso de purificación por dilución en agua para uno de los huevos purificados, es seguido mediante SDS-PAGE (Figura 3). Al ajustar el pH y centrifugar la yema es posible visualizar las livetinas (Figura 3 carril 2), en los carriles 4 y 5 se observa el pellet de proteínas luego de la precipitación con sulfato de amonio, donde se evidencia la presencia de diversas globinas, la eficiencia de la precipitación es clara al verificar la ausencia de proteínas en la fracción soluble resultante del tratamiento con sulfato de amonio (carril 3). También se observa la desaparición de otras proteínas, junto con la concentración de las IgYs conforme se lleva a cabo la purificación. En el carril 6 es de resaltar la presencia de dos bandas de 30 y 65 kDa, que corresponden a los pesos moleculares esperados para las cadenas liviana y pesada de las inmunoglobulinas IgYs reportados previamente. Es posible evidenciar también, dentro del perfil electroforético otras proteínas. La banda de 45 kDa presumiblemente represente a las  $\beta$ -livetinas (proteínas similares a  $\gamma$ -livetinas, compuestas principalmente de IgYs), que por su peso se cree que pertenezcan a un grupo más específico, el de las  $\alpha$ -2-glicoproteínas (24). Por su parte la banda de 38 kDa se atribuye a la fracción de  $\alpha$ -fosvitinas (16, 24).



**Figura 4.** Evaluación de los niveles de IgY presentes en la fracción soluble de las yemas de los huevos analizados mediante ELISA. Gris oscuro: muestras provenientes de la gallina inoculada con adyuvante sin antígeno. Gris claro: muestras provenientes de la gallina inoculada con la His-GiNMNAT. Eje X: determinación de la reacción colorimétrica para el sustrato OPD a una densidad óptica de 490 nm (OD 490 nm); eje Y: número de huevos colectados.



**Figura 5.** Purificación de las IgYs mediante resina de afinidad tiofilica. Gris oscuro: densidad óptica de las fracciones obtenidas a 280 nm. Gris claro: densidad óptica de las fracciones obtenidas a 490 nm (ELISA).

Los extractos obtenidos de las yemas colectadas después del proceso de deslipidación se evaluaron mediante ELISA con el objeto de identificar los huevos con mayor producción de anticuerpos. En la Figura 4 se resumen los resultados del ensayo de ELISA de los huevos colectados y procesados de ambos tratamientos (con y sin antígeno). A pesar de la irregularidad de la respuesta inmune es posible visualizar picos de mayor concentración de IgYs, posteriores a las inoculaciones. La ausencia de una tendencia regular en los datos no es inesperada, ya que el metabolismo de las aves se ve influenciado por condiciones fisiológicas y ambientales que no es posible controlar, lo cual determina oscilaciones en la producción de inmunoglobulinas en los diferentes momentos evaluados (22-27).

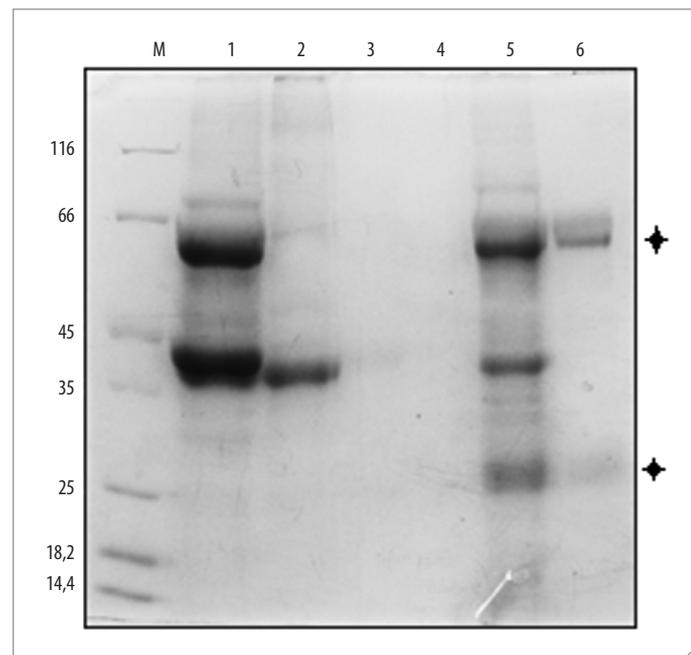
La respuesta inmune primaria al antígeno se caracteriza por producir anticuerpos de baja afinidad tras lo cual se generan células de memoria T y B (26-28). Gracias a la generación de procesos de memoria en el sistema inmune, en los refuerzos la presencia de una nueva estimulación antigénica genera una respuesta inmunológica más rápida, lo cual explica en parte el perfil obtenido (29). En la Figura 4 se pueden evidenciar picos de alta concentración de IgY; en este trabajo se escogió el huevo identificado con el número 30 para llevar a cabo la purificación total posterior a la solubilización. La Figura 4 también permite visualizar que la reacción de reconocimiento de las proteínas solubles obtenidas de la gallina inoculada (gris oscuro) es específica por el antígeno ya que está ausente en la gallina control inoculada solamente con adyuvante (gris claro).

Luego de determinar los picos de mayor producción de anticuerpos, se procedió a la purificación total de las IgY mediante cromatografía de afinidad tiofilica (Figura 5). Para ello, la fracción soluble del huevo 30 fue elegida por su elevado contenido de IgYs. La columna está constituida por esferas de agarosa químicamente unidas a 2-mercaptoetanol, y a su vez unidas a grupos divinilsulfona activados, que presentan una elevada afinidad por las inmunoglobulinas en presencia de sales liotrópicas (14, 17). Algunos autores (14, 16) describen el mecanismo de acción como la interacción entre el grupo tiol del 2-mercaptoetanol con regiones aromáticas de la proteína, principalmente residuos de triptófano y fenilalanina. No obstante, otros reportes refutan esta teoría y consideran que el mecanismo de acción está aún por determinar (17).

La Figura 5 muestra el perfil cromatográfico de la purificación por columna de afinidad tiofilica. En las primeras fracciones se eluyen proteínas que no presentan interacción con la resina; luego de eliminarlas se procede a la elución, donde se da un efecto inmediato de disociación de las uniones específicas de las proteínas con la resina y un consecuente aumento en la lectura a 280 nm (Figura 5). El pico más alto corresponde a la fracción obtenida en el momento de la aplicación del buffer de

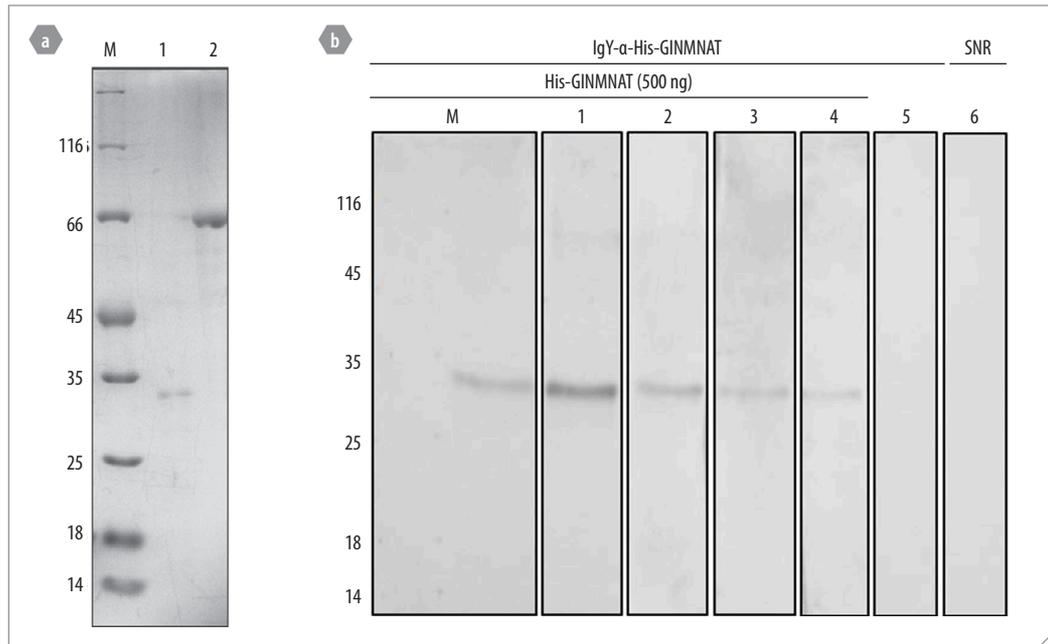
elución (Figura 5, fracción 40) la cual, al ser visualizada mediante SDS PAGE (Figura 6 carril 5), muestra el patrón electroforético característico de las IgY (bandas de 30 y 65 kDa), por lo que se logra una adecuada purificación de IgYs mediante esta metodología.

La fracción 40 se empleó en experimentos posteriores, así como el anticuerpo IgY de huevo. Para determinar la cantidad de proteína IgY presente, se cuantificó una alícuota mediante el método de Bradford como se describe en la metodología. Se obtuvo una concentración de 7,2 µg/µl, que equivale a un total de 14,4 mg de IgY para el huevo 30. Esta cantidad se encuentra dentro de rango obtenido para IgY purificadas por dilución en agua y cromatografía tiofilica para otros antígenos (16) y para otros anticuerpos IgY purificados por esta metodología (30). Del total de IgYs obtenidas, se espera que entre un 2 a un 10% corres-

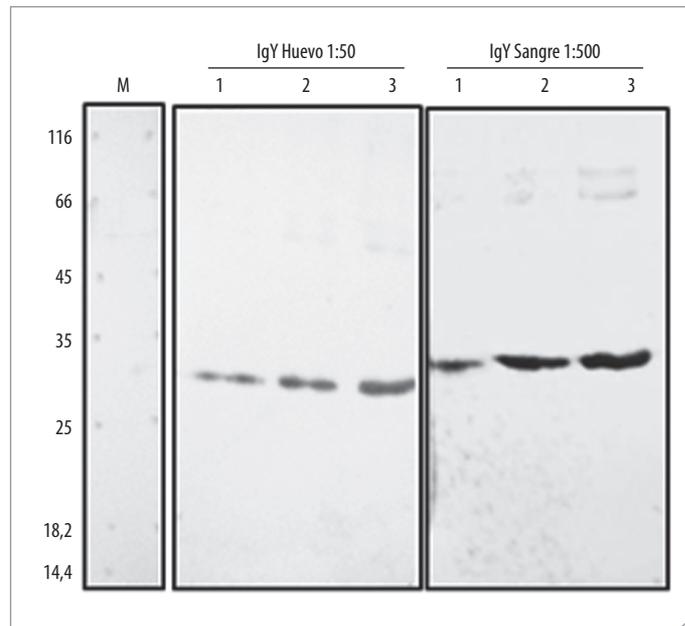


**Figura 6.** Perfil electroforético de la purificación de inmunoglobulinas aviares (IgYs) empleando resina de afinidad tiofilica. M: marcador de bajo peso molecular (kDa); 1: fracción 5 (proteínas no unidas); 2: fracción 13 (proteínas no unidas); 3: fracción 25 (proteínas no unidas); 4: fracción 29 (proteínas no unidas); 5: fracción 40 (elución de IgYs); 6: fracción 35 (proteínas eluidas). SDS-PAGE al 12%. Coomassie R-250.

**Figura 7.** Evaluación de IgY de huevo mediante *immunoblot* empleando 500 ng de proteína recombinante como antígeno. **a.** Gel SDS PAGE 12% M: marcador de bajo peso molecular (kDa); 1. His-GiNMNAT 500 ng; 2. BSA 500 ng. **b.** *Western Blot*. M: marcador de bajo peso molecular (kDa); 1. His-GiNMNAT / IgY 1:50; 2. His-GiNMNAT / IgY 1:100; 3. His-GiNMNAT / IgY 1:200; 4. His-GiNMNAT / IgY 1:500; 5. His-GiNMNAT / IgY 1:1000; 6. BSA [500 ng/μl] / IgY 1:50; 7. His-GiNMNAT / IgY 1:50 (no ilustrado). Revelado mediante el sistema peroxidasa de rábano (HRP).



pondan a IgY específicas contra el antígeno inoculado (25). Así, la metodología empleada para la purificación fue efectiva en la obtención de una gran cantidad de proteína IgY. La purificación de IgY puede llevarse a cabo mediante diversas metodologías; no obstante, para garantizar la eficiencia de un método, deben ser tenidos en cuenta tres factores determinantes: cantidad, pureza y actividad biológica de las inmunoglobulinas, además de los costos que involucre el proceso (16). El procedimiento utilizado en el presente trabajo se puede considerar como un método muy eficiente de obtención de anticuerpos a partir de la yema de huevo, considerando la relación costo/beneficio.



**Figura 8.** Evaluación de anticuerpos IgY sobre diferentes concentraciones de proteína recombinante mediante *immunoblot*: M: marcador de bajo peso molecular. 1. 15 ng His-GiNMNAT-A; 2. 30 ng His-GiNMNAT-A; 3. 60 ng His-GiNMNAT-A. IgY huevo: título 1:50 e IgY sangre: 1:500. Revelado mediante el sistema peroxidasa de rábano (HRP).

### Evaluación del título del IgY sobre la proteína recombinante

Para caracterizar el anticuerpo purificado se realizó la determinación del título mediante un ensayo de *immunoblot* en el cual se empleó como antígeno la proteína recombinante His-GiNMNAT (500 ng) purificada previamente desde los cuerpos de inclusión. La proteína para estos ensayos corresponde a la misma empleada para la inmunización de las gallinas. La Figura 7 muestra los resultados *immunoblot* al usar diferentes títulos del anticuerpo obtenido de huevo IgY-α-GiNMNAT (1:1000 – 7,22 ng/μl, 1:500 – 14,44 ng/μl, 1:200 – 36,10 ng/μl, 1:100 – 72,20 ng/μl y 1:50 – 144,40 ng/μl). Se evidencia reconocimiento de la proteína recombinante de 31 kDa desde 1:1000. También es clara la ausencia de reconocimiento de otras proteínas como BSA, que estaban presentes en las mismas cantidades y fueron tratadas con los mismos títulos, tanto como la ausencia de reconocimiento de las IgYs purificadas de las gallinas no inoculadas con el antígeno His-GiNMNAT empleando los mismos títulos.

Los títulos escogidos se probaron de acuerdo a ensayos estandarizados previamente para otros anticuerpos aviares obtenidos y purificados (16). Los títulos reportados para IgY varían de acuerdo con la cantidad de antígeno, el método de purificación utilizado y la cantidad de inoculaciones realizadas, por lo que no es posible comparar directamente el título obtenido con los reportados (16). Sin embargo, el título del anticuerpo obtenido concuerda con el registrado para antígenos similares de parásitos como *Leishmania spp.* (16).

Las NMNAT son enzimas de baja expresión en algunos organismos y/o tejidos celulares (3), por lo que es importante estandarizar el reconocimiento de cantidades muy bajas de proteína recombinante. Se realizó un ensayo de *immunoblot* sobre diferentes cantidades de His-GiNMNAT para determinar la cantidad mínima capaz de ser reconocida por los anticuerpos obtenidos. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 8. En adición, se muestra la detección de la proteína recombinante con una señal fuerte, incluso sobre cantidades tan reducidas como 15 ng. Se reconocen también algunas inespecificidades de mayor peso molecular la cuales corresponden a impurezas del antígeno que contiene cantidades bajas de otras proteínas de *E. coli* presentes en los cuerpos de inclusión; es de esperar que se produzcan anticuerpos contra estas proteínas contaminantes y, por tanto, una detección de las mismas empleando concentraciones elevadas de anticuerpos como en este ensayo.

De manera paralela, un mes después de la segunda inoculación, y para tener una fuente adicional de IgYs, se decidió tomar una muestra de sangre de 5 ml de la gallina de la cual se obtuvieron los huevos. Se evaluó el título del suero obtenido de forma similar a las IgYs de huevo sobre proteína recombinante (resultados no mostrados), obteniéndose un título de (1:500) para la detección de cantidades tan bajas como 15 ng de proteína recombinante (Figura 8). Los IgYs obtenidos del suero son igualmente eficientes en el reconocimiento de la proteína recombinante, constituyendo una fuente adicional de anticuerpo. Las IgYs de séricas no requieren una purificación posterior pero su disponibilidad es limitada debido a que se presentan en un volumen menor y su extracción involucra un proceso invasivo en el animal; ello fue contrario a lo observado en la obtención de IgYs de huevo.

### El anticuerpo IgY- $\alpha$ GiNMNAT purificado mediante afinidad sobre membranas de nitrocelulosa

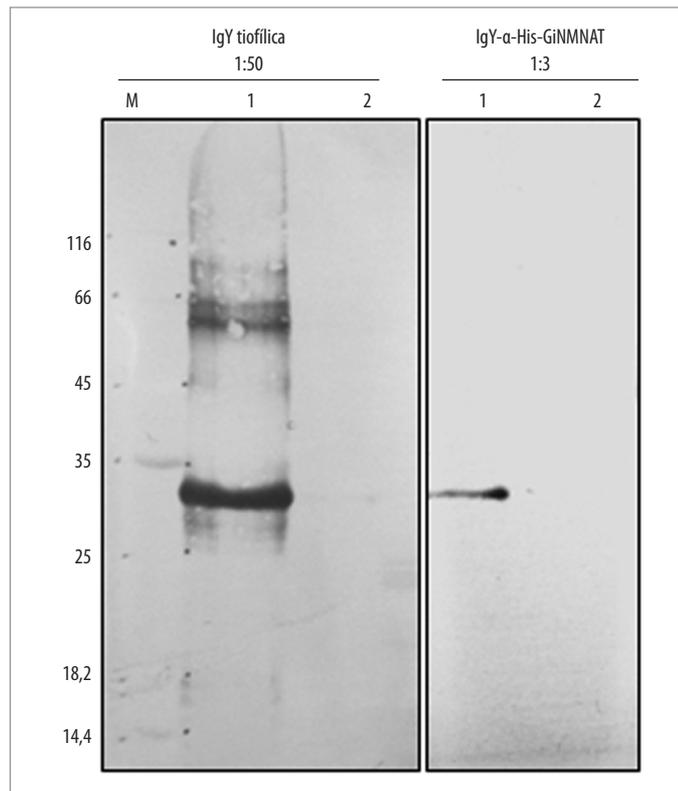
Cuando el anticuerpo IgY se emplea en altas concentraciones detecta, además de la proteína His-GiNMNAT de 31 kDa, una banda de alto peso molecular ( $\approx$  66 kDa); aprovechando la gran cantidad de anticuerpo IgY de huevo disponible, se abordó una estrategia adicional de purificación por afinidad al antígeno, previamente transferido e inmovilizado sobre membranas de nitrocelulosa, como se describe en la metodología. Los anticuerpos así purificados, fueron empleados para el reconocimiento de la proteína recombinante por *immunoblot*. La Figura 9 muestra la eficiencia del proceso de purificación en la eliminación de reconocimiento de proteínas inespecíficas de alto peso molecular en comparación con el anticuerpo inicial previamente purificado por afinidad tiofilica en título (1/50). Mediante el anterior proceso de purificación se logró la obtención de un anticuerpo IgY- $\alpha$ GiNMNAT de alta especificidad por la proteína recombinante His-GiNMNAT.

Este artículo describe una técnica para la obtención y purificación de IgYs a partir yemas de huevo cuya utilidad es extensa, ya que permite la obtención grandes cantidades de anticuerpos que pueden ser empleados para estudios diversos. El hecho de que las aves se encuentren filogenéticamente más distantes de los mamíferos hace ideal esta metodología para la obtención de anticuerpos contra antígenos de mamíferos sin lugar a reacciones cruzadas y con una alta especificidad. Además evita reacciones indeseadas con el sistema complemento u otros componentes del sistema inmune (16). Teniendo en cuenta lo anterior, para el caso particular de *Giardia intestinalis* –patógeno frecuente de mamíferos como conejos o ratones–, sus antígenos no constituyen buenos inmunógenos para la obtención de anticuerpos en estos modelos. Por ello es ventajoso para el estudio de la GiNMNAT-A emplear modelos aviares para la obtención de anticuerpos específicos

La NMNAT está presente en todos los organismos vivos conocidos hasta el momento, ya que cataliza el paso clave de la síntesis del NAD<sup>+</sup> (2). La obtención de anticuerpos IgYs- $\alpha$ His-GiNMNAT-A descrita en este artículo permitirá desarrollar estudios funcionales y celulares detallados en *Giardia intestinalis*. Adicionalmente, los anticuerpos desarrollados evidencian detección de proteínas NMNAT recombinantes obtenidas y purificadas de otros protozoarios, pero no de alguna proveniente de mamíferos (resultados no mostrados), lo cual demuestra que la herramienta inmunológica obtenida constituye una estrategia eficiente para el desarrollo de estudios acerca de la síntesis del NAD<sup>+</sup> en parásitos protozoos.

### Conclusión

Los cuerpos de inclusión obtenidos de la sobreexpresión de proteínas recombinantes –como His-GiNMNAT en sistemas heterólogos como *E. coli*–, constituyen una herramienta de utilidad para la obtención de an-



**Figura 9.** Reconocimiento de las GiNMNAT con anticuerpo IgY de huevo purificado mediante cromatografía tiofilica y purificado adicionalmente por afinidad al antígeno. M: marcador de bajo peso molecular (kDa); 1: His-GiNMNAT (+), 2: albúmina de suero bovino (BSA) (–). *Immunoblot* revelado a través del sistema peroxidasa de rábano (HRP).

ticuerpos policlonales. Además, pueden ser empleados como antígenos eficientes para conseguir una alta producción de anticuerpos, aprovechando un subproducto de la sobreexpresión de proteínas.

Se implementó y estandarizó un método para la producción y purificación de grandes cantidades de anticuerpos policlonales aviares (IgYs), a partir de la yema de huevo y empleando cuerpos de inclusión como antígeno. Se obtuvieron IgYs, tanto de yema de huevo como de plasma sanguíneo de las gallinas inoculadas, con capacidad para reconocer la proteína recombinante His-GiNMNAT. Adicionalmente, se probó un método para mejorar la especificidad del anticuerpo mediante una segunda purificación por afinidad al antígeno inmovilizado en membranas de nitrocelulosa, con la cual se obtuvo un reconocimiento específico de la proteína recombinante de 31 kDa.

### Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Nacional de Colombia, especialmente al Proyecto de Estudiante Auxiliar No. 17807/2063 y al proyecto de la DIB 14365.

### Referencias

- Morrison, G.; McArthur, G.; Gillin, F.; Aley, S.; Adam, R.; Olsen, G.; Sogin, M. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*. 2007. **317**(5846): 1921–1926.

2. Berger, F.; Ramírez-Hernández, M.; Ziegler, M. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.* 2004. **29**(3): 111–118.
3. Chiarugi, A.; Dölle, C.; Felici, R.; Ziegler, M. The NAD metabolome—a key determinant of cancer cell biology. *Nat. Rev. Cancer.* 2012. **12**(11): 741–752.
4. Lau, C. Functional Characterisation of Three Human Nicotinamide Mononucleotide Adenyltransferases. Dissertation for the degree philosophiae doctor. University of Bergen. 2008. Disponible: [https://bora.uib.no/bitstream/handle/1956/3283/Ph.\\_Thesis\\_CorinnaLau.pdf?sequence=1](https://bora.uib.no/bitstream/handle/1956/3283/Ph._Thesis_CorinnaLau.pdf?sequence=1) [consultado el 10 de diciembre de 2011].
5. Neme, R.; Ramírez-Hernández, M. Aproximación bioinformática y bioquímica al metabolismo del dinucleótido de nicotinamida (NAD<sup>+</sup>) en *Leishmania braziliensis*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 2008.
6. Jayaram, H.; Kusumanchi, P.; Yalowitz, J. NMNAT expression and its relation to NAD metabolism. *Curr. Med. Chem.* 2011. **18**(13): 1962–1972.
7. Garavaglia, S.; D'Angelo, I.; Emanuelli, M.; Carnevali, F.; Pierella, F.; Magni, G.; Rizzi, M. Structure of human NMN adenyltransferase. A key nuclear enzyme for NAD homeostasis. *J. Biol. Chem.* 2002. **277**: 8524–8530.
8. Lee, H. Physiological Functions of Cyclic ADP-Ribose and NAADP as Calcium Messengers. 2001. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001. **41**: 317–345.
9. Koch-Nolte, F.; Fischer, S.; Haaga, F.; Ziegler, M. Compartmentation of NAD<sup>+</sup>-dependent signalling. *FEBS Lett.* 2011. **585**(11): 1651–1656.
10. Manning, G.; Reiner, D.; Lauwaet, T.; Dacre, M.; Smith, A.; Zhai, Y.; Svard, S.; Gillin, F. The minimal kinome of *Giardia lamblia* illuminates early kinase evolution and unique parasite biology. *Genome Biol.* 2011; **12** (7):66–72.
11. Denu, J. Vitamins and aging: pathways to NAD<sup>+</sup> synthesis. *Cell.* 2007. **129**(3): 453–454.
12. Buitrago, J.; Ramírez-Hernández M. Aproximación al estudio del metabolismo del dinucleótido de nicotinamida adenina en *Giardia lamblia*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 2007.
13. Ramírez-Vargas, E.; Ramírez-Hernández, M. Evaluación del candidato a de la proteína NMNAT mediante herramientas bioquímicas. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 2010.
14. Bustos-Parra, V.; Ramírez-Hernández, M. Evaluación del candidato B de la proteína NMNAT de *Giardia lamblia* mediante herramientas bioinformáticas y bioquímicas. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 2007.
15. Singh, S.; Amulya, K. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 2005. **99**(4): 303–310.
16. Contreras, L.; Ramírez-Hernández, M. H. Aproximación al Metabolismo del Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD<sup>+</sup>) en *Leishmania*. *Rev. Asoc. Col. Cienc. (Col.)* 2010. **22**: 97–108.
17. Pinto, J.; Barco, M.; Afanador, M. C.; Merchán, A. M.; Montañez, M. F.; Andrade, F.; Torres, O. Obtención de anticuerpos policlonales IgY antiparvovirus canino a partir de yema de huevo de gallina. *Universitas Scientiarum.* 2005. **10**(1): 37–43.
18. Starr, T. Quantification of protein bands using densitometry. 2013. Disponible en: [http://www1.med.umn.edu/starrlab/prod/groups/med/@pub/@med/@starrlab/documents/content/med\\_content\\_370494.html](http://www1.med.umn.edu/starrlab/prod/groups/med/@pub/@med/@starrlab/documents/content/med_content_370494.html). [Consultado el 4 de mayo de 2013].
19. Akita, M.; Nakay, E. Immunoglobulins from Egg Yolk : Isolation and Purification. *J. Food Sci.* 1992. **57**(3): 8058–8070.
20. Barroso, P.; Murcia, H.; Vega, N.; Pérez, G. Obtención y purificación de IgY dirigidas contra la lectina de *Salvia bogotensis*. *Biomédica* 2005. **4**: 496–510.
21. García, D.; Nicholls, R.; Arévalo, A.; Torres O.; Duque, S. Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados en gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*. *Biomédica*. 2005. **25**: 451–463.
22. Sánchez-Lancheros, D.; Ramírez-Hernández M. Desarrollo de una herramienta inmunológica para el estudio de la Nicotinamida Mononucleotido AdenililTransferasa (NMNAT) en *Leishmania braziliensis*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 2011.
23. Fang, L. Antibody Purification from Immunoblotting. 2012. Disponible: <http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=133>. [Consultado el 18 de abril de 2013].
24. Rica, F. Métodos inmunológicos. 2007. Disponible. [http://medicina.ens.uabc.mx/manuales\\_laboratorio/LIM-N3-004.pdf](http://medicina.ens.uabc.mx/manuales_laboratorio/LIM-N3-004.pdf). [Consultado el 06 de junio de 2013].
25. Huopalahti, R.; López-Fandiño, R.; Anton, M.; Schade, R. Bioactive Egg Compounds. 1a. ed. Berlín-Heidelberg: Springer Verlag. 298 p. 2007. DOI 10.1007/978-3-540-37885-3.
26. Harlow, E.; Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual. 1st. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 726 p. 1988.
27. Levy, J.; Ibrahim, A.; Shirai, T.; Otha, K.; Nagasawa, R.; Yoshida, H.; Estesii, J.; Gardenerii, M. Dietary fat affects immune response, production of antiviral factors, and immune complex disease in NZB/NZW mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1982. **79**: 1974–1978.
28. Dubovi, E. J.; MacLachlan N. J. Fenner's Veterinary Virology. Fourth edition. Boston: Academic Press. p. 283. 2010.
29. Paul, W. E. Fundamental Immunology. 5th. edition. New York: Lippincott Williams & Wilkins. p. 1502. 2003.
30. Howard, G. C.; Kaser, M. R. Making and Using Antibodies: A Practical Handbook. 2nd edition. Boca Raton (FL, USA): CRC Press-Taylor & Francis Group. 2013.
31. Reyes-Montaña, E.; Lareo, L.; Pérez, G. Production and purification of IgY antibodies as a novel tool to purify the NR1 subunit of NMDA receptor. *Rev. Colomb. Quim.* 2012. **41**(1): 31–45.

**Article citation:**

Moreno-González, P. A.; Díaz, G.; Ramírez-Hernández, M. H. Producción y purificación de anticuerpos aviares (IgYs) a partir de cuerpos de inclusión de una proteína recombinante central en el metabolismo del NAD<sup>+</sup>. *Rev Colomb Quim.* 2013. **42**(2): 12–20.

## Capacidad antioxidante del arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) durante la maduración

### Resumen

El arazá es un fruto amazónico con buena capacidad antioxidante, como otras frutas de la región. A partir del epicarpio y mesocarpio de la fruta, en cuatro estados de madurez (verde, pintón, maduro y sobremaduro), se realizó la extracción de compuestos fenólicos utilizando como solvente una mezcla agua:metanol (inicial 50:50; posterior 70:30); para su análisis se recurrió al método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Dichos compuestos se identificaron parcialmente mediante HPLC en fase reversa con arreglo de diodos, encontrando los ácidos clorogénico, gálico y caféico como fenoles mayoritarios responsables de la actividad antioxidante. El mayor contenido de polifenoles en el mesocarpio fue en el estado verde (1200 mg/1000 g fruto BH), seguido del maduro (1100 mg/1000 g fruto BH), pintón (905 mg/1000 g fruto BH) y sobremaduro (550 mg/1000 g fruto BH), mientras que en el epicarpio fue mayor en los estados maduro (170 mg/1000 g fruto BH) y verde (295 mg/1000 g fruto BH), seguidos del pintón (100 mg/1000 g fruto BH) y sobremaduro (50 mg/1000 g fruto BH). La capacidad antioxidante se determinó usando métodos hidrofílicos (ABTS, DPPH y FRAP), encontrando que en el mesocarpio la capacidad antioxidante, medida por todos los métodos, fue mayor en estado verde, seguida por los estados maduro, pintón y sobremaduro; en el epicarpio fue mayor en los estados maduro y verde, seguida por pintón y sobremaduro. La capacidad

## Antioxidant capacity of araza (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) during the ripening

### Abstract

The araza is a fruit native of the Amazon region, like other fruits of this region has some antioxidant components. It was carried out the classification of the fruits of araza in four different stages (green, "pinton", mature, over-mature) using as the index of maturity, then phenolic compounds were extracted using mixtures of solvents (methanol:water, 50:50 initial, 70:30 final) and its content was determined by the spectrophotometric method Folin-Ciocalteu in the epicarp and mesocarp. Additionally, partially identified phenolic compounds by reversed phase HPLC with diode array, finding the phenolic acids such as chlorogenic, gallic and caffeic, such as phenols responsible for the majority of araza antioxidant activity. It was noted that araza mesocarp polyphenol content was higher in the green (1200 mg/1000 g BH fruit) stage followed by mature (1200 mg/1000 g BH fruit), pinton (905 mg/1000 g BH fruit) and over-mature (550 mg/1000 g BH fruit), while the epicarp was greater in stages mature (170 mg/1000 g BH fruit) and green (295 mg/1000 g BH fruit) followed by over-mature (50 mg/1000g BH fruit) and pinton (100 mg/1000g BH fruit) stages. The antioxidant capacity was determined by three hydrophilic methods (ABTS, DPPH and FRAP) in the mesocarp found that the antioxidant capacity was higher in the green state followed by mature, pinton and over mature, while the epicarp was higher in mature, green, pinton and over-mature state. We also determined the antioxidant capacity by a lipophilic method ( $\beta$ -carotene

## Capacidade antioxidante de aracá-boi (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) durante a maturação

### Resumo

O aracá-boi é um fruto originário da região amazônica que, como outros frutos desta região, possui alguns componentes com capacidade antioxidante que são de grande interesse para a saúde dos seres humanos pela sua capacidade de diminuir os efeitos de radicais livres, produzidos durante o metabolismo normal da célula. Neste trabalho foi realizada a classificação dos frutos de aracá-boi em quatro estádios diferentes, utilizando como critério o índice de maturação; posteriormente, a partir do epicarpo e mesocarpo da fruta nos quatro estádios de maturação (verde, pintado, maduro e sobremaduro) foram extraídos os compostos fenólicos utilizando misturas de solventes (metanol, água, 50:50) e foi determinado o seu conteúdo mediante o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Além disso, parcialmente identificados compostos fenólicos por HPLC de fase reversa com matriz de diodos, encontrando os ácidos fenólicos, tais como clorogênico, gálico e cafeico, tais como fenóis responsáveis pela maioria das Arazas actividade antioxidante. Foi observado que no mesocarpo do aracá-boi o conteúdo de polifenóis é maior no estágio verde (1200 mg/1000 g fruto BH) seguido dos estados maduro (1100 mg /1000 g fruto BH), pintado (905 mg/1000g fruto BH) e sobremaduro (550 mg/1000 g fruto BH) enquanto que no epicarpo é maior nos estádios maduro (170 mg/1000 g fruto BH) e verde (295 mg/1000 g fruto BH) seguido dos estádios pintado (100 mg/1000 g fruto BH) e sobremaduro (50 mg/1000 g fruto BH). A capacidade

antioxidante también se evaluó por un método lipofílico (decoloración del  $\beta$ -caroteno) hallando que en el mesocarpio fue mayor en los estados maduro (110 mg/1000 g fruto BH) y pintón (90 mg/1000 g fruto BH) seguido del sobremaduro (75mg/1000 g fruto BH) y verde (26 mg/1000 g fruto BH) y en el epicarpio es mayor en sobremaduro (50 mg/1000 g fruto BH) seguido del verde (45 mg/1000 g fruto BH), maduro (55 mg/1000 g fruto BH) y pintón (25 mg/1000 g fruto BH). Se concluye que el fruto de arazá, en los estados verde y maduro, presenta la mayor capacidad antioxidante, siendo los ácidos fenólicos, presentes en el mesocarpio y epicarpio, los principales responsables.

**Palabras clave:** Arazá, capacidad antioxidante, ABTS, DPPH, FRAP, decoloración del  $\beta$ -caroteno, madurez.

bleaching) found that in the mesocarp was higher in stages followed by mature (110 mg/1000 g BH fruit), pinton (90 mg/1000 g BH fruit) and green (26 mg/1000 g BH fruit) while in the epicarp was higher in the over-mature stage (50 mg/1000 g BH fruit) followed by green states (45 mg/1000 g BH fruit), mature (55 mg/1000 g BH fruit) and sobre mature (25 mg/1000 g BH fruit). It was concluded that the mature and green stages had the highest antioxidant capacity; phenolic compounds being present in the epicarp and mesocarp were the major contributors.

**Keywords:** Arazá, antioxidant capacity, ABTS, DPPH, FRAP,  $\beta$ -carotene bleaching, ripening.

antioxidante foi determinada por três métodos hidrofílicos (ABTS, DPPH y FRAP) e foi encontrado que no mesocarpio a capacidade antioxidante é maior no estágio verde seguido dos estádios maduro, pintado e sobremaduro enquanto que no epicarpio é maior nos estádios maduro e verde seguido dos estádios pintado e sobremaduro. Também se determinou a capacidade antioxidante por um método lipofílico (descoloração do  $\beta$ -caroteno) e foi encontrado que no mesocarpio é maior nos estádios maduro (110 mg/1000 g fruto BH) e pintado (90 mg/1000 g fruto BH) seguido dos estádios sobremaduro (75 mg/1000 g fruto BH) e pintado (26 mg/1000 g fruto BH) e no epicarpio é maior no estágio sobremaduro (50 mg/1000 g fruto BH) seguido dos estádios verde (45 mg/1000 g fruto BH), maduro (55 mg/1000 g fruto BH) e pinton (25 mg/1000 g fruto BH). Finalmente se conclui que o fruto de arazá-boi nos estádios verde e maduro apresenta a maior capacidade antioxidante, sendo os compostos fenólicos os principais contribuintes.

**Palavras-chave:** Arazá-boi, capacidade antioxidante, ABTS, DPPH, FRAP, descoloração do  $\beta$ -caroteno, maturação.

## Introducción

COMO PARTE NORMAL DEL METABOLISMO las células producen compuestos con electrones libres conocidos como 'radicales libres'. Estos son muy reactivos y, cuando no se controlan, pueden causar daño oxidativo a las moléculas de la célula (proteínas, ácidos nucleicos, entre otros), lo que origina un impacto negativo sobre el metabolismo celular. El exceso de radicales libres puede llevar a estrés oxidativo que es responsable de enfermedades como Alzheimer, cáncer, aterosclerosis, entre otras. Los compuestos que pueden atrapar los radicales libres, neutralizando su efecto sobre la célula se conocen como 'antioxidantes'; son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas evitando la formación de un exceso de radicales libres y, por tanto, evitando los efectos de éstos en la célula.

El estudio de los compuestos con capacidad antioxidante que provienen de frutas y verduras es de gran interés debido a que son compuestos de origen natural y a que no representan riesgos para la salud, ya que algunos antioxidantes sintéticos pueden presentar efectos secundarios que no son deseables. Medir la capacidad antioxidante de un fruto permite determinar qué tan útil puede ser para la salud humana y los efectos positivos puede aportar en la prevención de enfermedades causadas por el estrés oxidativo (1).

El arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) es un fruto originario de la región amazónica occidental, cultivado en países como Brasil, Perú, Ecuador, Bolivia y Colombia. La producción en Colombia se concentra en las regiones cálidas y húmedas, especialmente en el sur, donde los principales productores están en los departamentos de Guaviare, Caquetá y, en menor proporción, Putumayo. En la actualidad existen alrededor de 1200 hectáreas cultivadas con estos frutales amazónicos y a su explotación están vinculadas muchas familias de la región (2, 3).

El fruto de arazá se proyecta día tras día como un factor productivo que optimiza el perfil socioeconómico de la región amazónica occiden-

tal; sus características organolépticas lo hacen apetecible y sus componentes nutricionales prometen un beneficio para la salud de las personas que lo consuman dentro de su dieta regular (4). Garzón *et al.* (2012) encontraron que la pulpa de arazá es una fuente importante de vitamina C y compuestos fenólicos; por tanto la fruta puede tener un excelente potencial antioxidante. Sin embargo, no hay estudios sobre la identidad química de estos compuestos fenólicos en arazá (5). El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad antioxidante e identificar los principales fenoles del epicarpio y mesocarpio del arazá en cuatro etapas de madurez, con el fin de conocer cuál parte del fruto y en cuál estado de maduración se expresa la mayor acción antioxidante y el mejor beneficio de su consumo.

## Materiales y métodos

### Clasificación y procesamiento de los frutos

Los frutos fueron obtenidos de algunas centrales de abastos de la ciudad de Bogotá D.C. y fueron clasificados en cuatro estados de madurez (verde, pintón, maduro y sobremaduro), como criterios de selección se utilizaron inicialmente el color y la apariencia de los frutos. Después de desinfectados con solución de hipoclorito de sodio (0,01%), se procedió a la separación manual del epicarpio y el mesocarpio, en cada uno de los estados de madurez, para posteriormente someterlos a un proceso de liofilización con el fin de mantener las propiedades de cada estado estudiado; ello por cuanto el arazá, por ser un fruto climatérico, alcanza rápidamente la madurez fisiológica, dificultando el estudio del fruto sin ser procesado.

Sobre los liofilizados obtenidos se determinó directamente el índice de madurez en los cuatro estados, midiendo la cantidad de sólidos so-

lubles totales y la acidez titulable (6, 7). Estas mediciones se realizaron por triplicado.

A partir de las partes de los frutos liofilizados, se realizaron extracciones utilizando mezclas de solventes en un equipo Labcomco<sup>®</sup>; para ello se pesaron 1000 g de arazá liofilizado en un tubo Falcon y se adicionaron 20,0 mL de una mezcla metanol:agua (50:50), agitando fuertemente en vórtex a 50 °C durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min recogiendo el sobrenadante y almacenándolo a -5 °C en la oscuridad; sobre el residuo se realizaron dos extracciones sucesivas adicionando en cada una 10,0 mL de una mezcla acetona:agua (70:30), agitando en vórtex durante 30 min a 50 °C y centrifugando a 5000 rpm durante 20 min. Finalmente, se reunieron los tres sobrenadantes obtenidos y se almacenaron a -15 °C en la oscuridad. Para cada estado de madurez se realizaron tres extracciones, siendo estos extractos las muestras que se sometieron a análisis posteriores (8).

### Quantificación de compuestos fenólicos libres

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos libres se utilizó el método espectrofotométrico (espectrofotómetro Genesis V) de Folin-Ciocalteu. En un tubo Falcon de 15 mL se adicionaron 1500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido al 10% con agua desionizada y 200 µL de soluciones de compuestos antioxidantes (patrón de ácido gálico de diferentes concentraciones y extractos de muestras diluidos 20 veces), incubando a temperatura ambiente por 5 min. Luego se adicionaron 1500 µL de una solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 6% en agua desionizada y se agitó fuertemente en vórtex. La mezcla se dejó en reposo durante 90 min a temperatura ambiente en la oscuridad y se midió la absorbancia a 765 nm. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado (9).

### Quantificación de la capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante del fruto de arazá se determinó mediante los métodos ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfónico)], DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) y decoloración del  $\beta$ -caroteno (10).

#### Método ABTS

Se preparó una solución de ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfónico)] 7,0 mM y de persulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) 2,5 mM en agua desionizada y se dejó en agitación en 4 °C en la oscuridad durante 16 horas para generar el catión radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Luego la solución se diluyó cuidadosamente con metanol hasta obtener una absorbancia de 0,700 a 734 nm siendo esta la solución de trabajo (ST1). En un tubo Falcon se adicionaron 2000 µL de ST1 y se incubaron por 5 min a 30 °C; luego se adicionaron 20 µL de las soluciones de compuestos antioxidantes (extractos de muestras diluidos 12,5 veces en metanol), agitando en vórtex y se incubaron a 30 °C, tomando medidas de absorbancia a 734 nm cada 5 min durante una hora hasta absorbancia constante. Para la curva de calibración se tomaron 2000 µL de ST1, se incubaron por 5 min a 30 °C; a continuación se adicionaron 20 µL de solución de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-ácido tetrametilcroman-2-carboxílico, que es un análogo hidrosoluble de la vitamina E) en metanol de diferentes concentraciones, agitando en vórtex; se incubaron por 6 min a 30 °C y se midió la absorbancia a 734 nm. Todas las medidas se realizaron por triplicado (11).

#### Método DPPH

Se preparó una solución de DPPH 0,1 mM en metanol y se ajustó la absorbancia en 1100 a 515 nm usando metanol (ST2). En un tubo Falcon se adicionaron 1950 µL de la solución de trabajo (ST2) y se incubó por 7 min a temperatura ambiente tomando la medida de absorbancia inicial a 515 nm. Luego, se adicionaron 50 µL de cada extracto obtenido

(diluido 5 veces en metanol), se mezcló en vórtex, se incubó a temperatura ambiente y se tomaron medidas de absorbancia a 515 nm cada 5 min durante 2 horas. Para la curva de calibración se tomaron 1950 µL de ST2, se incubaron por 7 min y se midió la absorbancia inicial a 515 nm; luego se adicionaron 50 µL de la solución de Trolox en diferentes concentraciones, se mezcló en vórtex y se incubó por 7 min a temperatura ambiente; finalmente se midió la absorbancia a 515 nm. Todas las medidas se realizaron por triplicado (12).

#### Método FRAP

Inicialmente se preparó el reactivo de FRAP mezclando 5,0 mL de una solución de TPTZ (tripiridil-S-triazina) 10 mM en ácido clorhídrico (HCl) 40 mM con 5,0 mL de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) 20 mM en agua. Al obtener una coloración azul de la mezcla se adicionaron 50,0 mL de buffer acetato 300 mM (pH = 3,6). En un tubo Falcon se adicionaron 2700 µL del reactivo de FRAP y se incubaron a 37 °C por 4 min., luego se adicionaron 270 µL de agua desionizada y 90 µL de los extractos diluidos 10 veces en metanol o agua, dependiendo de la curva de calibración usada. Se realizaron dos curvas de calibración utilizando en una Trolox y en otra sulfato de hierro(II) heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Se tomaron 2700 µL del reactivo de FRAP y se incubaron por 4 min a 37 °C, luego se adicionaron 270 µL de agua desionizada y 90 µL de las soluciones de Trolox o de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  de diferentes concentraciones; se mezcló en vórtex incubando por 4 min a 37 °C y se midió la absorbancia a 593 nm. Todas las medidas se realizaron por triplicado (13).

#### Decoloración del $\beta$ -caroteno

En este método se mide la capacidad antioxidante lipofílica; por tanto, es necesario realizar una extracción diferente a la de los métodos anteriores. Para esto se pesaron 0,100 g de arazá liofilizado (epicarpio o mesocarpio) en un tubo Falcon, se agregaron 4,00 mL de acetona y se agitó el tubo en vórtex; luego se centrifugó a 5000 rpm por 15 min y se repitió este proceso tres veces sobre el residuo con 2,00 mL de acetona. Los sobrenadantes obtenidos se reunieron y se almacenaron a -15 °C en la oscuridad (1).

En tubos Falcon se agregaron 500 µL de una solución de  $\beta$ -caroteno de concentración 0,4 mg/mL preparada en cloroformo; luego se adicionaron 20 µL de ácido linoléico, 200 µL de Tween 20 y 200 µL de solución patrón de Trolox o de las muestras, según el caso. Se agitó fuertemente en vórtex y se adicionaron 50 mL de agua saturada con oxígeno; se repitió la agitación y se sometió el contenido del tubo a ultrasonido por 10 min. Luego se incubó a 50 °C con agitación constante y cada 10 min se llevó a ultrasonido por 2 min; se tomaron medidas de absorbancia a 470 nm, repitiendo este procedimiento durante dos horas. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Después de obtener las medidas planteadas anteriormente se realizó una prueba F en ANOVA para comprobar si existía alguna diferencia significativa entre las medias de cada grupo de datos y, por medio de una prueba de rangos múltiples, se determinaron aquellas medias que presentaban diferencias estadísticamente significativas unas de otras con un nivel de confianza del 95%.

### Identificación parcial de los compuestos fenólicos por HPLC

#### Extracción

Para este análisis se pesaron 200 mg de muestra (epicarpio o mesocarpio, liofilizado) en un tubo plástico cónico, se adicionaron 2 mL de una solución de metanol acidulado (80:19:1, metanol:agua:HCl), se agitó a temperatura ambiente en vórtex durante 1 min y luego se sonicó durante 1 h a 40 °C. Se centrifugó a 6000 rpm por 15 min. El sobrenadante obtenido se filtró a través de membranas PVDF de 13 mm de diámetro y 0,22 µm de tamaño de poro y se inyectó en el cromatógrafo para identificar y cuantificar los compuestos fenólicos.

**Tabla 1.** Gradiente de elución de fenoles en HPLC de fase reversa.

Tiempo (min)	(%) Agua mQ pH 2,5	(%) ACN
0	95	5
4	85	15
7	80	20
20	95	5

**Tabla 2.** Condiciones cromatográficas de bomba y DAD para el análisis de fenoles en HPLC de fase reversa.

Método	Flujo	T° columna	Longitud de onda (nm)
Fenoles	1 mL/min	35 °C	$\lambda_1 = 324$ $\lambda_2 = 280$ $\lambda_3 = 220$

**Identificación parcial por HPLC en fase reversa-arreglo de diodos**

El método para el análisis cromatográfico de compuestos fenólicos se desarrolló en un cromatógrafo líquido Agilent Technologies<sup>®</sup> 1260 con bomba cuaternaria de presión máxima de 600 bares, inyector automático estándar 1260 Infinity<sup>®</sup> para viales de 2 ml y volumen de inyección de 5  $\mu$ L. La separación de fenoles se obtuvo en una columna Agilent Zorbax<sup>®</sup> AAA (150 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m) en compartimiento termostatzado 1260 Infinity<sup>®</sup> y detector de arreglo de diodos (DAD) 1260 Infinity<sup>®</sup>. El gradiente empleado se describe en la Tabla 1. Las demás condiciones cromatográficas se observan en la Tabla 2. Tanto el método de extracción, como el de análisis de fenoles por HPLC, se pusieron a punto para este trabajo.

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó usando patrones de ácidos caféico, clorogénico y gálico mediante comparación del tiempo de retención de los patrones y las longitudes de onda de máxima absorción ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  y  $\lambda_3$ ) de los espectros UV-VIS. La cuantificación se obtuvo mediante interpolación en curvas de calibración realizadas con los patrones (10-100 mg/ml).

**Análisis de datos**

Se empleó el promedio como medida de centralización. Para evaluar las diferencias específicas entre los valores de cada uno de los parámetros evaluados se usó la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD) con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . Gráficamente, letras diferentes indican diferencias significativas en los valores de las medidas realizadas.

**Tabla 3.** Índice de madurez del fruto de arazá liofilizado en diferentes estados de maduración.

Estado de madurez	Acidez titulable (% ác. málico)	Sólidos solubles (°Brix)	Índice de madurez (°Brix / % ác. málico)
Verde	6,82 $\pm$ 0,30	5,0 $\pm$ 0,1	0,73 $\pm$ 0,03
Pintón	5,55 $\pm$ 0,11	6,5 $\pm$ 0,1	1,17 $\pm$ 0,01
Maduro	4,64 $\pm$ 0,18	7,0 $\pm$ 0,2	1,51 $\pm$ 0,10
Sobremaduro	4,52 $\pm$ 0,06	7,5 $\pm$ 0,1	1,66 $\pm$ 0,05

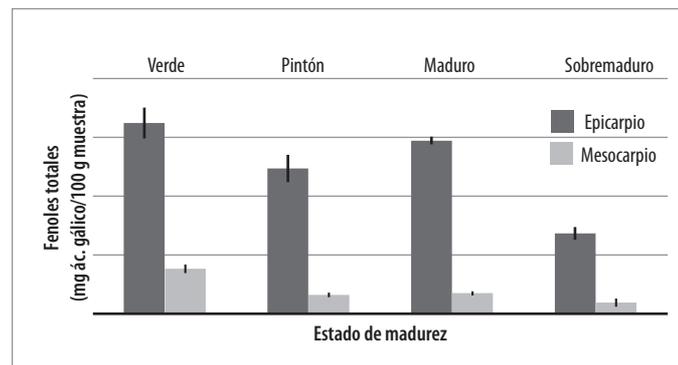
**Resultados y discusión****Clasificación y procesamiento de los frutos**

El índice de madurez es un parámetro fisicoquímico de gran importancia para la correcta clasificación de los frutos en diferentes estados de maduración. Por tanto, se midió este parámetro sobre los frutos liofilizados utilizando un refractómetro para determinar la cantidad de sólidos solubles totales expresados como °Brix y una titulación ácido-base con hidróxido sodio 0,1 M para establecer la acidez titulable (que se reporta como porcentaje de ácido málico por cada 100 g de fruto) (Tabla 3).

La clasificación hecha inicialmente con base en el color y apariencia concuerda con los valores obtenidos para el índice de madurez, puesto que se observan diferencias entre los valores obtenidos para los diferentes estados, valores que van aumentando durante el proceso de maduración. Este fenómeno no ha sido reportado en la literatura hasta el momento, siendo más altos que los de otras frutas tropicales como la guayaba (8) y la uva (9).

**Cuantificación de compuestos fenólicos libres**

La cuantificación de fenoles totales se determinó en los extractos obtenidos de epicarpio y mesocarpio de arazá liofilizado utilizando el método de Folin-Ciocalteu. En la Figura 1 se observa que el contenido de fenoles es mayor en el estado verde, tanto en epicarpio como en mesocarpio, seguido por el estado maduro, el estado pintón y, finalmente, el sobremaduro. Al aplicar la prueba estadística de rango múltiple entre muestras se encontró que en el mesocarpio del arazá los valores obtenidos para los estados pintón y maduro son estadísticamente iguales, indicando que el contenido de fenoles libres es igual en ambos estados a pesar de la diferencia en la madurez del fruto.

**Figura 1.** Cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu en el fruto de arazá.

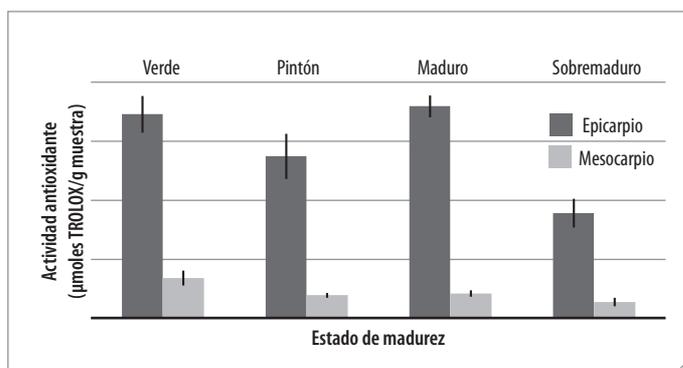


Figura 2. Medida de la actividad antioxidante por el método ABTS en el fruto de arazá.

### Quantificación de la capacidad antioxidante total

Los distintos métodos utilizados para medir la capacidad antioxidante se deben a la alta capacidad que tienen los polifenoles como antioxidantes, pues cada método de medida es sensible a las distintas características redox del compuesto polifenólico. Los métodos ABTS y DPPH actúan sobre polifenoles donores de átomos de hidrógeno a radicales oxidantes, estabilizándolos y disminuyendo así su poder oxidante; el método FRAP actúa sobre los polifenoles capaces de donar electrones reduciendo intermediarios oxidados, mientras que el método de decoloración del  $\beta$ -caroteno actúa deslocalizando y estabilizando los electrones recibidos de un radical libre. Por tanto, para determinar la capacidad antioxidante total de un fruto, debe medirse la actividad antioxidante mediante cada uno de estos métodos para poder determinar, tanto el efecto de neutralización de radicales libres, como su capacidad de reducción (14).

El primer método aplicado a los cuatro extractos obtenidos del fruto de arazá fue el método ABTS, que permite medir la capacidad de los polifenoles, o moléculas con capacidad antioxidante, de captar radicales libres y que se sigue espectrofotométricamente a una longitud de onda de 734 nm. Los valores de actividad antioxidante obtenidos por este método, utilizando el Trolox como patrón, se observan en la Figura 2 y muestran que en el epicarpio del fruto de arazá la capacidad antioxidante medida es mayor (y estadísticamente igual) en los estados verde y maduro, mientras que en el mesocarpio, la mayor capacidad antioxidante se presenta en el estado verde, seguida de los estados pintón y maduro que no presentan diferencias significativas entre sí; y, finalmente, el estado sobremaduro. Según estos datos la capacidad de captar radicales libres es mayor en el estado verde del fruto, lo que está relacionado con el mayor contenido de fenoles. El segundo método utilizado fue el DPPH (2,2-difenil-2-picrilhi-

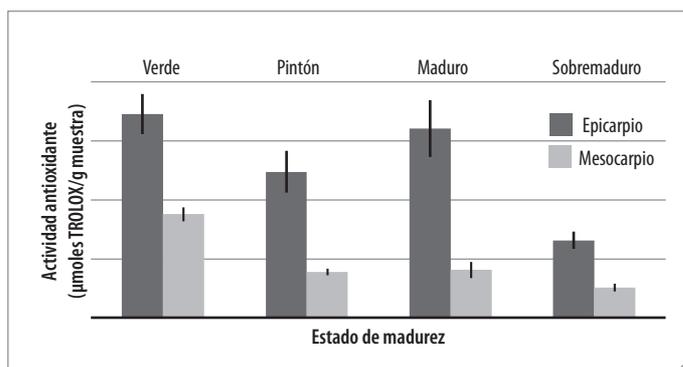


Figura 4. Medida de la actividad antioxidante por el método FRAP en el fruto de arazá usando Trolox como patrón.

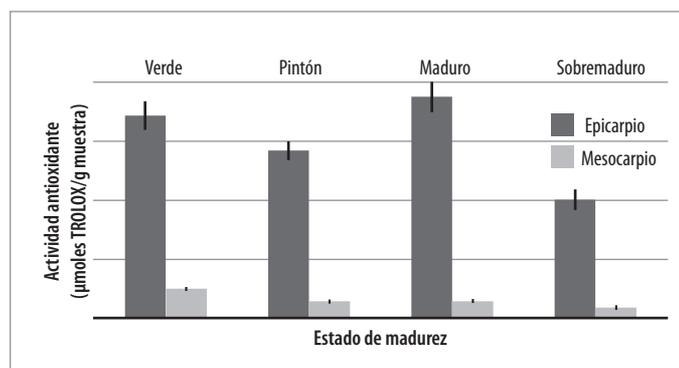


Figura 3. Medida de la actividad antioxidante por el método DPPH en el fruto de arazá.

drazilo). Al igual que el método ABTS, este método mide la capacidad de captar radicales libres por parte de los polifenoles y demás especies con capacidad antioxidante, siguiendo las reacciones por espectrofotometría a una longitud de onda de 515 nm. Al observar los datos obtenidos (Figura 3), la capacidad antioxidante en el epicarpio del arazá es mayor en el estado maduro seguida de los estados verde, pintón y sobremaduro mientras que, en el mesocarpio el mayor valor se da en el estado verde, observando además que los estados pintón y maduro no presentan diferencias significativas entre sí y que el estado sobremaduro presenta la menor capacidad de captar radicales libres. Al comparar los métodos ABTS y DPPH hay concordancia en la medida de capacidad antioxidante en el mesocarpio del fruto de arazá y una ligera diferencia entre los valores obtenidos sobre el epicarpio en el estado maduro.

Los resultados obtenidos con los métodos ABTS y DPPH muestran que en todas las medidas el método DPPH arrojó resultados menores, lo que indica que los ensayos realizados con este método son menos específicos y selectivos, como se reporta en la literatura (9).

A diferencia de los métodos anteriores, el método FRAP mide la capacidad de reducción de un antioxidante mediante transferencia de un electrón (es decir, el paso de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  en el complejo  $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ), siguiendo el proceso por espectrofotometría a una longitud de onda de 593 nm. Para el método FRAP se utilizaron dos compuestos como patrones, Trolox (al igual que en los métodos anteriores) y sulfato de hierro(II) ( $FeSO_4$ ). Utilizando Trolox como patrón se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 4, en la que se observa que la capacidad antioxidante en el epicarpio del arazá es mayor en los estados verde y maduro, seguida por la capacidad de los estados pintón y sobremaduro; en el mesocarpio, la mayor capacidad de reducción se presenta en el estado verde, seguida por los estados pintón y maduro (que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí) y, finalmente, el estado sobremaduro.

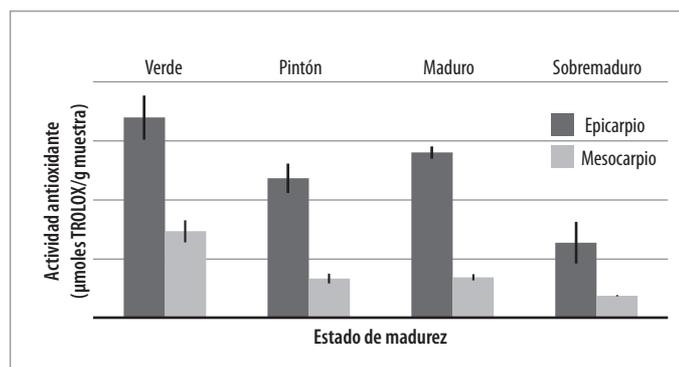


Figura 5. Medida de la capacidad antioxidante por el método FRAP en el fruto de arazá usando  $FeSO_4$  como patrón.

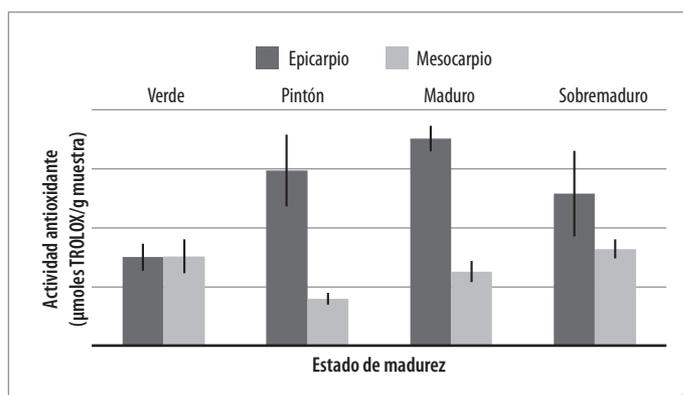
**Tabla 4.** Coeficientes de correlación lineal entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante hidrofílica en el fruto de arazá.

Método	Epicarpio	Mesocarpio
ABTS	0,946	0,990
DPPH	0,888	0,985
FRAP (Trolox)	0,993	0,998
FRAP (FeSO <sub>4</sub> )	0,983	0,998

Al realizar la medida de la capacidad antioxidante por el método FRAP en los cuatro estados de maduración utilizando como patrón FeSO<sub>4</sub> (Figura 5) se observa que la mayor capacidad antioxidante en el epicarpio del arazá se presenta en el estado verde, seguida de los estados maduro, pintón y siendo el menor el sobremaduro, mientras que en el mesocarpio la capacidad antioxidante es mayor en el estado verde, seguida de los estados pintón y maduro (que son estadísticamente iguales) y menor en el estado sobremaduro. Las diferencias en el método FRAP al utilizar patrones diferentes se deben a la diferencia de los mecanismos de reacción que tiene el reactivo de FRAP con el Trolox y el FeSO<sub>4</sub>.

La capacidad antioxidante hidrofílica determinada por los métodos anteriores se debe a compuestos como polifenoles, vitaminas hidrosolubles como el ácido ascórbico, y otros compuestos. Al relacionar el contenido de fenoles del arazá en sus cuatro estados de madurez con la medida de capacidad antioxidante se observa una correlación lineal con coeficientes de correlación cercanos a 1,00 (Tabla 4). Este comportamiento permite atribuir la capacidad antioxidante hidrofílica a los compuestos polifenólicos presentes en el arazá, los cuales no han sido reportados en la literatura previamente.

El último método que se aplicó para realizar la comparación de la capacidad antioxidante fue el de decoloración del β-caroteno. En éste, se promueve la peroxidación térmica del ácido linoléico en presencia de O<sub>2</sub> para formar el radical peroxilo; este radical puede ser neutralizado por el β-caroteno ocasionando la ruptura de su conjugación manifestándose en el proceso de decoloración que puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 470 nm. Entre más capacidad antioxidante tenga el compuesto evaluado, menor será la decoloración del β-caroteno. Para este método se realizó una nueva extracción utilizando acetona en las partes comestibles del fruto en los cuatro estados de madurez. En la Figura 6 se reportan los valores obtenidos para dicha actividad; en el caso del mesocarpio del arazá el estado sobremaduro, al igual que el estado verde, presentan la mayor capacidad antioxidante lipofílica, seguida de los estados maduro y pintón; en el epicarpio se ob-

**Figura 6.** Medida de la actividad antioxidante por el método de decoloración del β-caroteno en el arazá.**Tabla 5.** Ecuaciones de las curvas de calibración empleadas para la cuantificación cromatográfica de los compuestos fenólicos presentes en el fruto de arazá.

Ácido	Longitud de onda	Curva de calibración	R <sup>2</sup>
Gálico	220nm	Y=29,30X + 0,44	0,99
Clorogénico	320nm	Y=14,31X - 0,16	0,99
Caféico	320nm	Y=18,60X + 0,91	0,99

serva que el estado maduro presenta la mayor capacidad antioxidante, seguida de los estados pintón, sobremaduro y verde.

Si bien no es tan marcada la diferencia en la capacidad antioxidante hidrofílica en los estados verde y maduro, esta capacidad disminuye con el estado de madurez, ya que los fenoles (que son los principales contribuyentes a esta capacidad) se oxidan de acuerdo al proceso respiratorio del fruto durante la maduración.

Los valores obtenidos por el método de decoloración del β-caroteno son diferentes a los encontrados por los métodos ABTS, DPPH y FRAP, ya que estos últimos miden la actividad antioxidante de los componentes hidrofílicos del fruto (como fenoles o algunas vitaminas), mientras que el primero cuantifica la actividad antioxidante de compuestos lipofílicos como los carotenoides (5).

### Cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos

La identificación preliminar de los compuestos fenólicos, presentes en la mesocarpio y el epicarpio del fruto de arazá en diferentes estados de maduración fue realizada mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

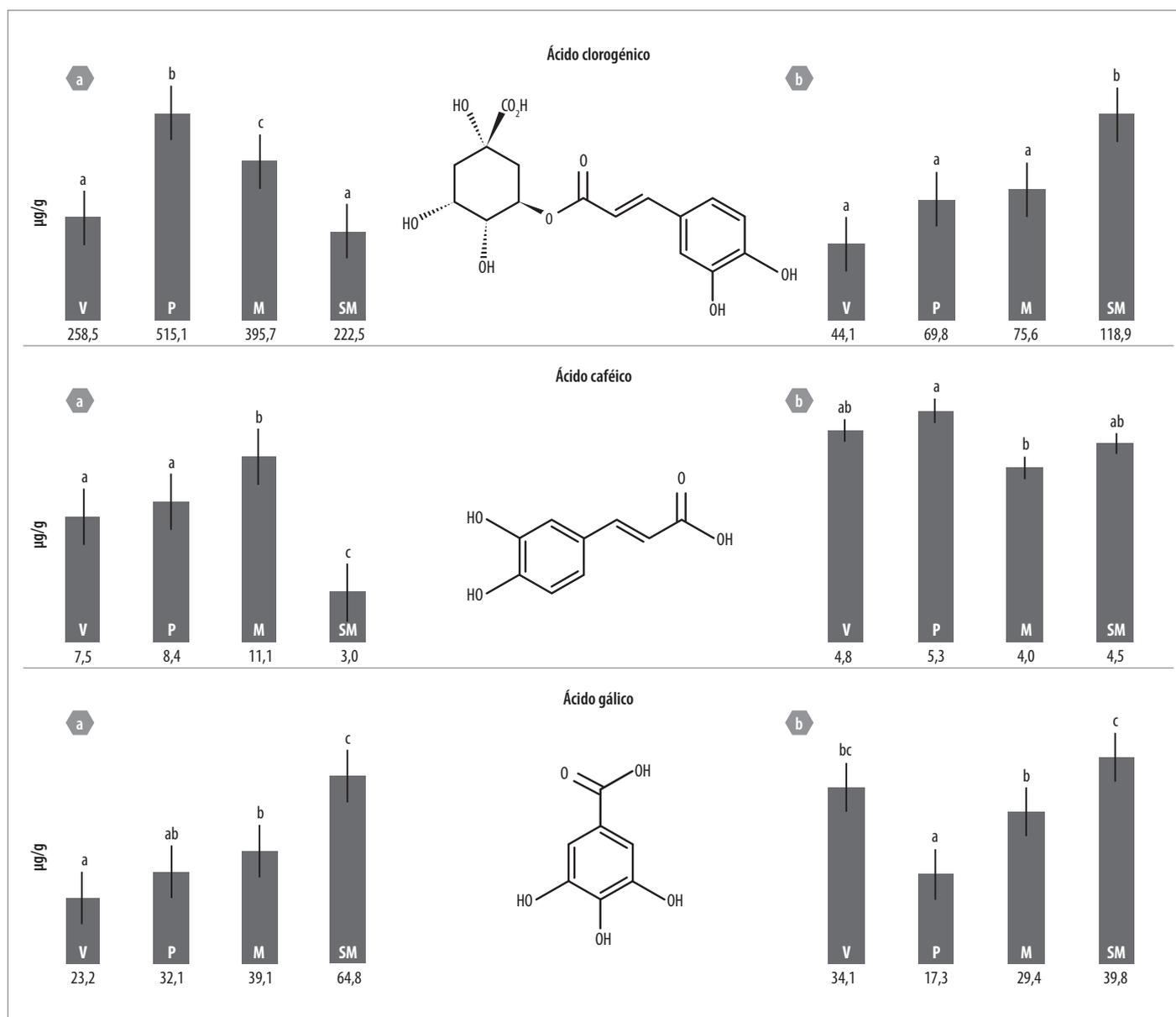
Para confirmar la identidad de los compuestos, se realizó el análisis comparativo espectral UV-VIS con los compuestos patrones de cada uno de los picos, en la cual los picos de las muestras presentan los mismos máximos de absorción, así como la misma forma del espectro que los patrones correspondientes, lo que permite confirmar la identidad de los picos de ácido gálico, caféico y clorogénico, cuyos tiempos de retención fueron idénticos a los de los compuestos identificados.

Una vez identificados los ácidos fenólicos presentes en el mesocarpio y epicarpio de arazá, estos se cuantificaron mediante interpolación en curvas de calibración realizadas con los patrones. Los datos de las curvas para cada ácido fenólico se observan en la Tabla 5.

En la Figura 7 se observa que el ácido clorogénico en el epicarpio logra un valor máximo en el estado pintón, pero luego empieza a decrecer; por el contrario, en el mesocarpio este ácido aumenta su concentración conforme avanza la maduración del fruto.

La concentración del ácido caféico disminuye durante la etapa de senescencia, mientras que la concentración del ácido gálico tuvo una tendencia a aumentar durante la maduración, tanto en el epicarpio como en el mesocarpio. También se puede observar que el ácido clorogénico es el compuesto fenólico que presenta mayor concentración, cerca de 500 µg/g en el estado pintón y 500 µg/g en el estado maduro en el epicarpio y aproximadamente 115 µg/g en el estado sobremaduro y 75 µg/g en el estado maduro en el mesocarpio; así, este compuesto podría presentar la mayor contribución a la capacidad antioxidante en el fruto de arazá, seguido por el ácido gálico. Cabe resaltar que el ácido clorogénico es el compuesto fenólico más abundante en plantas y también el antioxidante más activo de este grupo de compuestos (5).

Se ha determinado la capacidad antioxidante de las pulpas de los frutos tropicales de (mora, uva, açai, guayaba, fresa, acerola, piña, mango, graviola, cupuaçu y maracuyá) aplicando el método ABTS con medidas



**Figura 7.** Cuantificación de los ácidos fenólicos por HPLC-DAD extraídos del arazá en diferentes estados de maduración. (a) epicarpio; (b) mesocarpio. V: verde; P: pintón; M: maduro; SM: sobremaduro.

a dos tiempos (1 y 7 minutos), DPPH (30 y 60 minutos) y DMPD (10 minutos). Los valores TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox) obtenidos de las pulpas, oscilan entre mínimos y máximos de 2,0 y 67,2  $\mu\text{mol/g}$  aplicando el ensayo ABTS, 1,02 y 67,0  $\mu\text{mol/g}$  aplicando DPPH. La capacidad antioxidante obtenida por los métodos ABTS y DPPH se encuentra correlacionada con el contenido de compuestos fenólicos y antocianos, lo que demuestra que el arazá posee una mayor capacidad antioxidante en el epicarpio comparado con las demás frutas (15).

## Conclusiones

El arazá presenta una mayor actividad antioxidante en el estado verde, la cual disminuye conforme avanza el grado de madurez, especialmente en el epicarpio. Su capacidad antioxidante es principalmente de tipo hidrofílico y se debe principalmente a los compuestos ácidos fenólicos, en especial, al ácido clorogénico.

## Referencias

1. Velioglu, Y.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B. Antioxidant Activity and Total Phenolics In Selected Fruits, Vegetables and Grain Products. *J. Agric. Food Chem.* 1998. **46**: 4113-4117.
2. Do Nascimento, S.; De Oliveira, D.; Wachter, O. Arazá (*Eugenia stipitata*): Cultivo y Utilización: Manual Técnico. Ed. Secretaria Pro Tempore, 1999.
3. Fernández-Trujillo, J. P.; Carrillo, M. P.; Barrera, J. A.; Hernández, M. S. Arazá. En: Tropical fruit. Yahia, E.M. (editor). Cambridge (UK): Woodhead Publishing. pp. 98-115. 2011.
4. Hernández, M.; Barrera, J.; Carrillo, M. Arazá. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas. pp. 10-11. 2006.
5. Garzón, A.; Narváez, C.; Rache, E.; Kopec, A.; Barry, M.; Kenneth, M. Determination of Carotenoids, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh), an Amazonian Fruit. *J. Agric Food Chem.* 2012. **60**(18): 4709-4717.

6. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Productos de Frutas y Verduras. Determinación de Acidez Titulable. Bogotá: ICONTEC, 1999. 6 p. (NTC 4623).
7. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Jugos de Frutas y Hortalizas. Determinación del Contenido de Sólidos Solubles. Método refractométrico. Bogotá: ICONTEC, 1999. 9p. (NTC 4624).
8. Espinal M. Capacidad Antioxidante y Ablandamiento de la Guayaba Palmira ICA I (*Psidium guajava* L.) durante el Proceso de Maduración. Tesis Magister en Ciencias Química. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá, Colombia. p. 150. 2010.
9. Magalhaes L. Automatic Method for The Determination of Folin-Ciocalteu Reducing Capacity in Food Products. *J. Agric. Food Chem.* 2006. **54**: 5241-5246.
10. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005. **53**: 1841-1856.
11. Re, R. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolouration Assay. *Free. Radic. Biol. Med.* 1999. **26**: 1231-1237.
12. Sharma O. DPPH Antioxidant Assay Revisited. *Food Chem.* 2009. **13**: 1202-1205.
13. Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* 1996. **239**: 70-76.
14. Brand, W.; Cuvulier, M.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1995. **28**: 25-33.
15. Kuskoski, C. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M. Aplicación de Diversos Métodos Químicos para Determinar Actividad Antioxidante en Pulpa de Frutos. *Cienc. Technol. Aliment., Campinas.* 2005. **25**(4): 726-732.

**Article citation:**

Cuellar, F. A.; Ariza, E.; Anzola, C.; Restrepo, P. Estudio de la capacidad antioxidante del arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) durante la maduración. *Rev Colomb Quim.* 2013. 42(2): 21-28.

## Evaluación del movimiento de plaguicidas hacia la cuenca del Lago de Tota, Colombia

### Resumen

La cuenca del Lago de Tota es una de las principales zonas productoras de cebolla en Colombia. Las prácticas agrícolas convencionales utilizan plaguicidas para combatir las enfermedades que atacan al cultivo, siendo los fungicidas los más usados, pues las condiciones climáticas de páramo (3.015 msnm) favorecen la proliferación de hongos en el suelo y en los cultivos. Con el objetivo de evaluar el movimiento de los plaguicidas al lago de Tota, se tomaron muestras de agua y sólidos sedimentables durante siete meses en algunos canales que recorren la zona y desembocan en el lago. En aguas superficiales se determinó la presencia de malatión, tebuconazol, difenoconazol y clorotalonilo; algunas muestras superaron el límite de cuantificación de la metodología. Por su parte, en las muestras de sólidos sedimentables se encontró malatión y clorotalonilo en concentraciones de 1,90 mg/kg a 4,38 mg/kg y de 0,27 mg/kg a 1,29 mg/kg, respectivamente. Como complemento, se evaluó el movimiento superficial de los fungicidas tebuconazol y difenoconazol en una parcela de escorrentía ubicada en la zona de estudio, encontrando tebuconazol y difenoconazol en forma disuelta a concentraciones de 4800 ng/L y 330 ng/L, respectivamente. Finalmente, se utilizó el *Pesticide Impact Rating Index* (PIRI) para evaluar el riesgo potencial de movilidad de los plaguicidas, encontrando un riesgo entre alto y muy alto de movilidad hacia aguas superficiales; estos resultados concordaron con las evaluaciones experimentales.

## Evaluation of pesticides movement towards Tota Lake catchment, Colombia

### Abstract

The Tota lake catchment is a major onion-producing area in Colombia. Conventional agricultural practices use pesticides to control diseases that attack the crop, and in onion- production in this area fungicides are most commonly used due to the Paramo weather conditions and its location, 3015 meters above sea level (masl). These factors are conducive to the proliferation of fungi in the soil and in crops. In order to evaluate the movement of pesticides to Lake Tota, water samples and suspended sediments were taken for seven months in several channels that traverse the area and flow into the lake. In surface waters, malathion, tebuconazole, difenoconazole and chlorothalonil were detected and even quantified in some samples. In suspended sediments, malathion was detected at concentrations between 1.90 mg/kg and 4.38 mg/kg, and chlorothalonil ranged from 0.27 mg/kg to 1.29 mg/kg. To determine concentrations of fungicides in surface water closer to the source water samples from a runoff plot located in the study area were monitored for tebuconazole and difenoconazole. In dissolved form, tebuconazole was found at a concentration of 4800 ng/L and difenoconazole at a concentration of 330 ng/L. The Pesticide Impact Rating Index (PIRI) was used to assess the risk of surface water contamination by pesticides commonly used in onion production. Index values indicating high to very high risk of surface water contamination were found. These results agree with the experimental evaluations.

## Avaliação de pesticida movimento em direção Tota bacia do Lago, Colombia

### Resumo

A bacia do Lake Tota é uma cebola maiores áreas produtoras na Colômbia. Práticas agrícolas convencionais que utilizam pesticidas para controlar as doenças que atacam a cultura, sendo os fungicidas mais utilizados, porque as condições climáticas da saúde (3015 metros acima do nível do mar) são propícias para a proliferação de fungos no solo e nas culturas. A fim de avaliar o movimento de pesticidas no lago de Tota, as amostras de água e de sólidos sedimentáveis de sete meses em alguns canais que atravessam a área e correm para o lago. Na água de superfície foi encontrada malatión, tebuconazol, difenoconazol e clorotalonil e até mesmo em algumas amostras, as concentrações excederam o limite de quantificação, enquanto que nas amostras de sólidos sedimentáveis são encontrado presença de malatión e clorotalonil em concentrações entre 1,90 mg/kg – 4,38 mg/kg e 0,27 mg/kg – 1,29 mg/kg, respectivamente. Para complementar esse estudo, avaliamos o movimento da superfície de fungicidas tebuconazole e difenoconazole em uma trama escoamento localizado na área de estudo. Tebuconazole e difenoconazole encontrado na forma dissolvida, em concentrações de 4800 ng/L e 330 ng/L, respectivamente. Usado o *Pesticide Impact Rating Index* (PIRI) para avaliar o risco potencial de encontrar amobilidade de pesticidas entre risco alto e muito alto de mobilidade em águas de superfície, estes resultados foram consistentes com as avaliações experimentais.

**Palabras clave:** escorrentía, plaguicidas, aguas superficiales, Lago de Tota, cuenca.

**Keywords:** Runoff, pesticides, surface water, sediments, Lake Tota, catchment.

**Palavras-chave:** escoamento, pesticidas, água de superfície, sedimento, bacia, Tota Lago.

## Introducción

Debido a las diferentes altitudes y características topográficas presentes en Colombia, se encuentran diversos climas a lo largo de todo el territorio que favorecen el desarrollo de diferentes tipos de cultivos. Aunque Colombia es conocido por ser un exportador de algunos productos agrícolas como el café, en las últimas décadas y con la apertura de los tratados de libre comercio, se ha diversificado la exportación de productos agrícolas hacia Europa y Estados Unidos (1). Durante los últimos años, en Colombia y en el mundo, ha sido posible satisfacer la demanda de productos agrícolas y minimizar las pérdidas en la producción gracias al uso de plaguicidas; sin embargo su uso se ha incrementado en tal magnitud que entre los años 2004 y 2010 hubo un aumento del 16% en el consumo de agroquímicos, lo cual se traduce en 131 418 209 kg y 206 557 182 L de formulaciones de plaguicidas vendidas (2).

El Lago de Tota es uno de los principales sistemas hidrológicos del país, ya que es el cuerpo de agua natural con mayor extensión y sus aguas son aprovechadas para el cultivo de trucha arcoíris, actividades de recreación, así como fuente para el abastecimiento de agua potable de diferentes municipios de la zona (3). Debido a su riqueza hidrológica, la cuenca del Lago de Tota se ha convertido en una de las principales zonas agrícolas del país, lo cual se refleja en una producción de 131 451 toneladas de cebolla por año con un rendimiento de 34,53 toneladas por hectárea (4).

En los cultivos de cebolla larga ubicados a lo largo de la cuenca del lago, es común el uso de plaguicidas para el control de las plagas que atacan este cultivo, dentro de las que se encuentran el mildeo veloso, la mancha púrpura, la pudrición blanca, entre otras enfermedades (5).

Diferentes autores han reportado que las prácticas agrícolas convencionales ocasionan la liberación de plaguicidas al medio ambiente, los cuales pueden tener una serie de procesos de transformación y transporte. Dichos procesos dependen, tanto de las condiciones de la región (pluviosidad, topografía del terreno, cobertura vegetal y tipo de suelos), como de las propiedades fisicoquímicas inherentes del compuesto contaminante tales como presión de vapor, solubilidad en agua, tiempo de vida media, coeficiente de adsorción de carbono orgánico (Koc), coeficiente de partición octanol-agua (Kow) (6).

Otros estudios han reportado que la presencia de plaguicidas en los suelos se relaciona directamente con el contenido de materia orgánica, pues a mayor contenido, aumenta la adsorción de los plaguicidas y disminuye su movilidad a través del perfil de este cuerpo natural. En este sentido, cuando existe una fuerte adsorción de los plaguicidas en el suelo, el mecanismo más probable de transporte hacia cuerpos de agua es a través de fenómenos de erosión o escorrentía superficial (7). De igual manera, se ha reportado que si el plaguicida presenta una alta solubilidad en agua y una baja constante de adsorción, los mecanismos de movilidad hacia aguas ocurren mediante escorrentía y/o lixiviación (8).

En la actualidad, el plan de ordenamiento de la cuenca del lago de Tota, se ha convertido en el estudio más relevante relacionado con la zona; en éste se determinó la calidad fisicoquímica y microbiológica de las principales corrientes de agua. Aunque es un estudio que reúne bastante información acerca de la región, no incluye la evaluación de residuos de plaguicidas en matrices ambientales (3).

En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo llevar a cabo una evaluación de la movilidad de plaguicidas hacia el lago de Tota, para lo cual se realizaron encuestas con el fin de identificar los plaguicidas y las prácticas agrícolas que se emplean en la zona; posterior a ello se efectuó monitoreo sobre fuentes de agua que atraviesan los cul-

tivos y, paralelamente, se evaluaron muestras de sedimentos. Finalmente, se aplicó el *Pesticide Impact Rating Index* (PIRI) como herramienta para predecir el riesgo potencial de transporte de los plaguicidas hacia acuíferos en la zona de estudio (9).

## Materiales y métodos

### Área de estudio

El área de estudio se localizó en la vereda Hato Laguna (Municipio de Aquitania, Boyacá, Colombia), ubicada en la cuenca del Lago de Tota. La región de estudio se caracteriza por tener cultivos intensivos de cebolla larga (*Allium fistulosum*). El monitoreo de plaguicidas en agua y sedimentos se realizó en la corriente “Las Cintas”, la cual recorre parte de la vereda Hato Laguna y desemboca en el Lago de Tota; éste tiene un área de 55,1 km<sup>2</sup>, con 11,8 km de largo por 6,2 km de ancho y una profundidad media de 60 metros. Se encuentra situado a 3015 msnm. La temperatura en la cuenca del lago de Tota presenta fuertes fluctuaciones que pueden variar entre 0 °C y 22 °C (10).

El lago cuenta con dos regímenes de lluvia: interandino efecto bimodal en la cuenca occidental (730 mm/año) y el efecto monomodal en la región noreste (945 mm/año), produciendo un período de lluvias en los meses de abril a noviembre y una temporada seca de diciembre a marzo (11, 12).

### Uso de plaguicidas

La información sobre el uso de plaguicidas en los cultivos de cebolla larga se recolectó por medio de entrevistas personales con 30 agricultores de la región; a partir de esta información se estableció que la aplicación de plaguicidas en los cultivos de cebolla larga se realiza por medio de aspersiones con bombas manuales de mezclas de los diferentes principios activos. La frecuencia de fumigación es de cada ocho días en época de lluvia y cada quince días en época seca. Las principales enfermedades que atacan a los cultivos de cebolla son causadas por hongos, por lo que la mayoría de plaguicidas que se aplican son fungicidas. En la Tabla 1 se presentan los plaguicidas usados en los cultivos de cebolla, así como las cantidades aplicadas y la cantidad de veces que se aplica cada plaguicida al año, expresada en porcentaje (% uso). Esta información permite identificar los plaguicidas que se emplean en mayor dosificación y aquellos que se emplean más frecuentemente en los cultivos de cebolla de la región de estudio.

### Muestreo de agua y sedimentos

#### Aguas superficiales

La Tabla 2 muestra las fechas de muestreo de aguas superficiales y de sedimentos suspendidos; estos muestreos se dividieron en siete campañas en el periodo comprendido entre febrero y agosto de 2009, a lo largo de la corriente “Las Cintas”. Esta corriente fue seleccionada porque su caudal recorre zonas densamente cultivadas y sus aguas desembocan directamente al Lago de Tota. El muestreo realizado fue completamente al azar, recolectando una muestra de agua en cada estación de muestreo por cada campaña.

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas usados en la zona de estudio.

Ingrediente activo	Koc (L/kg) <sup>a</sup>	Log Kow <sup>a</sup>	DT <sub>50</sub> soil días <sup>a</sup>	Cantidad aplicada al año (kg/ ha) <sup>b</sup>	Uso (%) <sup>b</sup>
Azoxistrobina	423	2,50	70	3,9	31,0
Clorotalonilo	850	2,94	22	3,0	27,6
Cimoxanil	43,6	0,67	0,7	18,3	89,7
Ciproconazol	390	3,09	114	0,4	20,7
Deltametrina	460 000	4,60	13	9,3	41,4
Difenoconazol	3760	4,20	120	5,4	17,2
Dimetoato	30,1	0,70	2,6	3,6	6,9
Dimetomorf	348	2,68	57	18,9	62,1
Folpet	304	3,02	4,7	1,4	62,1
Malatión	217	2,75	0,2	3,2	58,6
Metalaxil	500	1,65	42	1,9	17,2
Metamidofos	1	-0,79	3,5	2,6	3,4
Monocrotofos	18,9	-0,22	7	11,3	3,4
m-Paratión	240	3,00	12	0,7	3,4
Oxadecil	36	0,65	75	1,9	6,9
Profenofos	2016	1,70	7	3,3	10,3
Propiconazol	1086	3,72	214	10,9	6,9
Tebuconazol	992	3,70	62	21,7	27,6
λ cihalotrina	157 000	6,90	25	0,9	10,3

<sup>a</sup> Datos obtenidos de: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm>.

<sup>b</sup> Datos obtenidos por medio de encuestas a los agricultores.

A lo largo de esta corriente, se establecieron cinco estaciones de muestreo una de ellas ubicada en una zona no intervenida con cultivos en la cual se encontraba vegetación nativa de la región, ésta se consideró como muestra de referencia (zona de control). Tres estaciones se ubicaron en zonas densamente cultivadas (estaciones 2, 3 y 4) y una estación se ubicó en la desembocadura de la corriente "Las Cintas" al Lago de Tota (estación 5). Adicionalmente, se ubicó otra estación en un canal

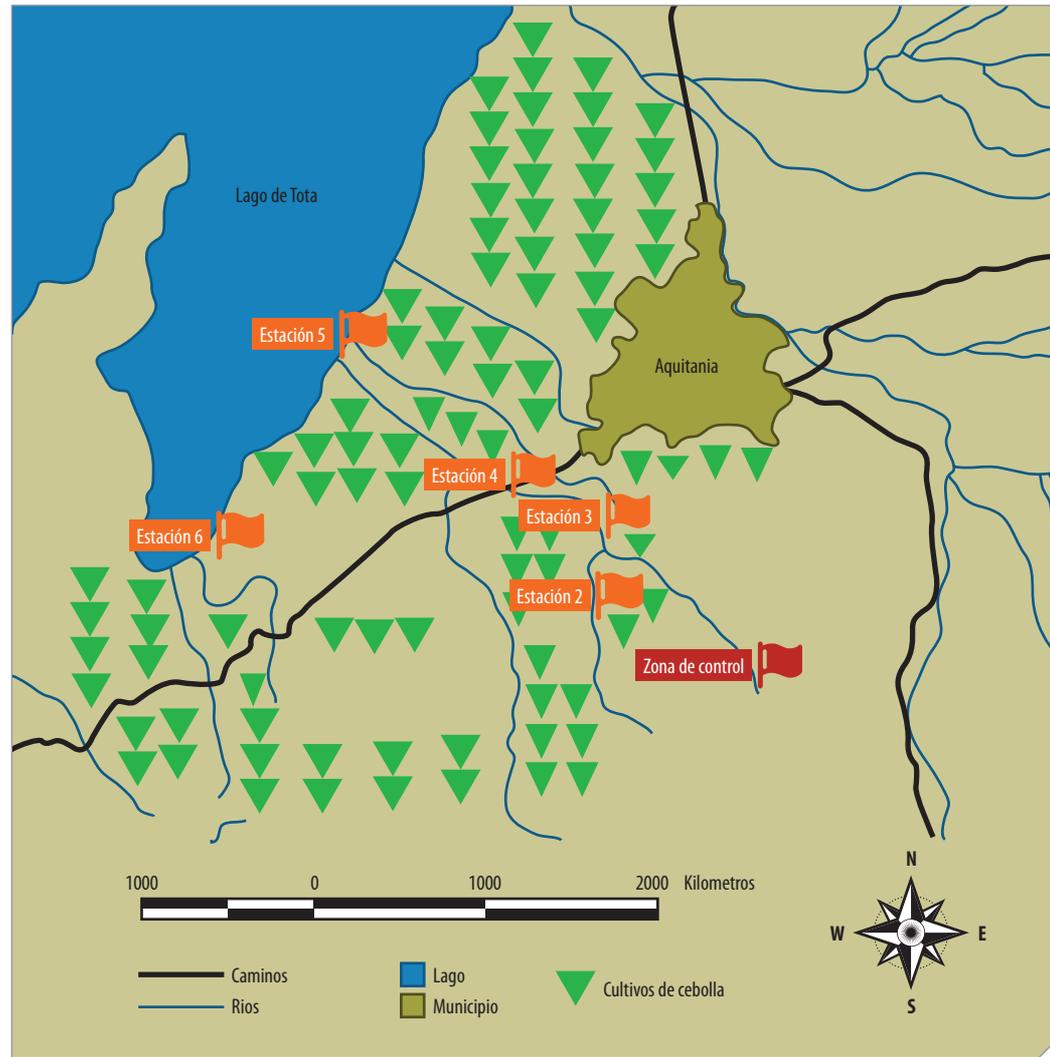
que recorre predios cultivados y desemboca directamente en el lago de Tota (estación 6). La Figura 1 muestra la localización de cada estación.

Las muestras de agua superficial fueron recolectadas en botellas de vidrio ámbar con capacidad de 4 L; las botellas fueron previamente lavadas con jabón neutro y purgadas con acetona y agua destilada. Las muestras de agua fueron recolectadas en cada sitio de muestreo por inmersión directa de las botellas en contra del flujo de la corriente. Se

**Tabla 2.** Campañas de muestreo de aguas y sedimentos suspendidos.

Número de campaña de muestreo	Fecha de muestreo de agua superficial	Fecha de muestreo de sedimentos suspendidos
1	15 febrero	---
2	22 febrero	---
3	22 marzo	22 de marzo a 13 de abril
4	25 abril	13 de abril a 3 de mayo
5	23 mayo	23 de mayo a 15 de junio
6	18 julio	-
7	23 agosto	23 de agosto a 14 de septiembre

**Figura 1.** Localización del área de toma de muestras y de las estaciones de muestreo en la corriente "Las Cintas".



transportaron inmediatamente al laboratorio donde fueron refrigeradas a 4°C hasta su análisis. El análisis de las muestras se realizó por duplicado.

#### Sólidos sedimentables

En el fondo de la corriente de la estación de muestreo 4 se instaló un dispositivo para recolección de sólidos sedimentables. El dispositivo utilizado fue reportado por Liess *et al.* (14) y Jergentz (15). El dispositivo consistía en un contenedor de 4 litros que estaba equipado con una entrada y una salida de la corriente de agua, permitiendo que los sedimentos se depositaran en el interior del contenedor. La recolección de estas muestras se realizó en cuatro períodos de 20 días cada uno, como se muestra en la Tabla 2.

#### Parcela de escorrentía

En este experimento se empleó el montaje descrito por Martínez (13); para ello se aisló un área de 1 m<sup>2</sup>, sobre un terreno cultivado con cebolla larga (pendiente 30 grados); por medio de láminas metálicas de dimensiones conocidas (100 cm de largo por 30 cm de alto). Las láminas metálicas que forman las paredes se introdujeron en el suelo a una profundidad de 10 cm sobresaliendo 20 cm por encima del terreno, esto con el fin de aislar el terreno hidrológicamente.

Durante un período de seis meses se recolectaron muestras de agua y sedimentos provenientes de la escorrentía producida por eventos de lluvia; la cantidad de precipitación total durante el período de muestreo fue de 561,2 L/m<sup>2</sup> y la cantidad de muestra recolectada fue de 25 L/m<sup>2</sup>, la

cual se recogió por medio de un dispositivo que contaba con un tanque cerrado.

Los principios activos aplicados en los cultivos de cebolla donde se encontraba instalada la parcela fueron tebuconazol y difenoconazol y las cantidades totales aplicadas durante el período de muestreo fueron de 6 kg/ha y 0,3 kg/ha respectivamente.

#### Información pluviométrica

Los datos pluviométricos durante el período del estudio fueron suministrados por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia (IDEAM), a través de la estación Corriente Las Cintas (No. 3519001). La Figura 2 muestra que las primeras campañas de muestreo se realizaron en un período de bajas precipitaciones mientras que las otras campañas se llevaron a cabo en época de alta precipitación.

#### Estándares, reactivos y soluciones

Los estándares de plaguicidas empleados en este trabajo fueron obtenidos del Dr. Ehrenstorfer y de Chemservice, cada uno con una pureza superior al 95%. Las soluciones madre fueron preparadas a concentraciones cercanas a 500 µg/mL en acetato de etilo y fueron almacenadas en frascos ámbar a -20 °C. La mezcla de plaguicidas se preparó en acetato de etilo tomando diferentes volúmenes de cada una de las soluciones

madre hasta obtener un rango de concentraciones entre 1,5 µg/mL y 44 µg/mL. Esta se almacenó en frascos ámbar a -20 °C. Todos los solventes empleados en este estudio fueron J.T. Baker grado residuos.

### Metodologías de extracción

#### Extracción de plaguicidas en aguas

Se realizó por medio de una extracción líquido-líquido empleando n-hexano como solvente de extracción. Se tomaron 1000 mL de muestra (previamente filtrada a través de papel de filtro cuantitativo) en una botella de vidrio ámbar de fondo plano, con capacidad de un litro, se adicionaron 10 g de cloruro de sodio y 60 mL de n-hexano. La botella tapada se colocó en agitación magnética durante 30 minutos, luego se realizó la recolección de la fase orgánica (16).

La fase orgánica se pasó sobresulfato de sodio y se concentró a través de un rotaevaporador a una temperatura de 35 °C y los plaguicidas fueron transferidos cuantitativamente con acetato de etilo a un balón aforado de 1 mL.

Muestras de agua potable fueron fortificadas para los experimentos de recuperación en un rango de concentraciones de 0,05 µg/mL a 2,30 µg/mL. Los porcentajes de recuperación (%R) se encontraron entre 76%-106% y los coeficientes de variación (% CV) entre 3%-13%, respectivamente. Estos datos cumplen con lo establecido por US-EPA (%R: 70-130% y CV<30%) (17).

#### Extracción de plaguicidas en sedimentos

Se empleó una extracción fraccionada con acetato de etilo y metanol asistida con ultrasonido (18). La exactitud de la metodología fue evaluada por medio de muestras fortificadas (%R entre el 70% y 120% y %CV< 20%).

La extracción de las muestras se realizó pesando 5 g de sedimento los cuales fueron agitados con 30 mL de acetato de etilo durante 30 minutos en un baño de ultrasonido, luego fueron centrifugados y filtrados a través de sulfato de sodio anhidro, tomando 15 mL de la fracción orgánica. Posterior a esto se realizó una segunda extracción con 30 mL de metanol. Se combinaron los extractos de acetato de etilo y metanol y fueron concentrados en un evaporador rotatorio a 35°C hasta 1mL. El extracto fue secado en corriente de nitrógeno y el residuo se disolvió en 2 mL de acetato de etilo para inyectarlo en el cromatógrafo de gases.

Los límites de detección y de cuantificación se establecieron de acuerdo al método propuesto por la US-EPA (19). La calibración se realizó en extractos blanco de agua potable. La Tabla 3 muestra los porcentajes de recuperación, los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (LC) determinados para los plaguicidas estudiados en agua y en sedimentos.

Se utilizaron PCB 104 (2,2',4,6,6'-pentaclorobifenil) y TPP (trifenil fosfato) como compuestos subrogados para controlar el desempeño de las metodologías analíticas, evaluando los porcentajes de recuperación de dichos compuestos en cada una de las muestras.

#### Análisis instrumental y confirmación

La identificación y cuantificación de los plaguicidas se realizó por cromatografía de gases en un equipo HP6890 plus con inyector automático 7683 Agilent Technologies® (Palo Alto, CA, EUA). Se utilizaron dos detectores en paralelo uno de microcaptura electrónica (µECD) y el otro un detector de nitrógeno-fósforo (NPD). Las condiciones de operación fueron previamente reportadas por Ahumada y Guerrero (20).

Las muestras en las que se encontraron plaguicidas se confirmaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM), utilizando un cromatógrafo de gases 7890 A de Agilent Technologies® (Palo Alto, CA, EUA) y un detector selectivo de masas 5975 C, cuyas condiciones fueron reportadas previamente (21).

**Tabla 3.** Porcentaje de recuperación, límites de detección y límites de cuantificación para los plaguicidas estudiados en aguas y sedimentos.

Plaguicidas analizados en agua	% Recuperación	LD <sup>a</sup> (ng/L)	LC <sup>b</sup> (ng/L)
Permetrina µECD <sup>c</sup>	106	2,59	8,53
Pirimetanil NPD <sup>d</sup>	82	10,83	35,73
β ciflutrina µECD	94	4,85	16,00
Hexaconazol µECD	84	6,79	22,40
FentionNPD	82	1,54	5,07
Clorotalonilo µECD	87	3,93	16,05
Difenoconazol µECD	85	3,13	13,95
Profenofos NPD	83	2,91	9,60
Cipermetrina µECD	89	2,34	7,73
Isofenfos µECD	89	4,85	16,00
Metilparatión µECD	82	3,25	10,73
Fenitrotion µECD	90	2,83	9,33
Malation NPD	91	11,10	40,35
Fentoato NPD	76	1,29	4,27
Tetradifon µECD	86	4,61	15,20
λ Cyhalotrina µECD	88	1,54	5,07
Ciproconazol µECD	102	13,45	43,73
Tebuconazol NPD	92	36,66	102,95
Clorpirifos µECD	92	1,86	6,13
Diclofuanid µECD	86	1,09	3,60
Folpet µECD	78	1,81	5,97
Diazinon µECD	84	9,97	32,90
Azoxistrobina NPD	87	0,51	1,67
ClorotaloniloµECD	97	0,02	0,07
Cimoxanil µECD	79	0,57	1,99
CiproconazolµECD	97	0,31	1,09
Deltametrina µECD	96	0,05	0,19
Difenoconazol µECD	83	0,02	0,07
Dimetoato NPD	86	0,39	1,27
Dimetomorf NPD	80	1,17	3,88
Folpet µECD	92	0,34	1,20
Malatión µECD	99	0,06	0,22
Metilparatión µECD	99	0,10	2,24
Oxadecil µECD	63	0,68	5,25
Profenofos µECD	99	0,07	2,67
Propiconazol µECD	92	0,05	0,35
Tebuconazol NPD	85	0,18	2,37
λ Cihalotrina µECD	95	0,03	0,24

<sup>a</sup> LD= Límite de detección; <sup>b</sup> LC = Límite de cuantificación; <sup>c</sup> µECD = detector de microcaptura electrónica; <sup>d</sup> NPD = detector de nitrógeno fósforo.

**Tabla 4.** Parámetros de entrada para calcular el índice PIRI en las parcelas seleccionadas.

Parámetros	Parcela 1	Parcela 2
Tipo de suelo*	Franco arcilloso loam	Franco arcilloso
Contenido de materia orgánica en el suelo%**	8,27	3,14
Diámetro del cuerpo de agua más cercano(m)***	1,5	0,7
Distancia del borde del cultivo a la fuente de agua más cercana (m)***	2	2
Pendiente (grados)***	30	0
Ancho de la zona Buffer (m)***	0	0
Promedio estimado de pérdida de suelo durante el periodo de estudio (tn/ ha)	0,7	20
Condiciones de humedad del suelo durante el periodo de interés***	Húmedo	Húmedo
Precipitación total durante el periodo de interés (mm)****	698,6	698,6
Promedio máximo de temperatura del aire (°C)***	11	11

\*Determinado por el método de Bouyouco; \*\*Determinado por el método de Walkley y Black; \*\*\*Medida realizada en campo; \*\*\*\*Datos tomados de IDEAM.

Este cromatógrafo contaba con un inyector de temperatura programada, lo que permitió inyectar volúmenes superiores a los convencionales y alcanzar menores límites de detección que los alcanzados con el equipo en el que se realizó la identificación inicial de los plaguicidas. La confirmación se realizó empleando los parámetros de calidad propuestos por la Unión Europea, para lo cual se monitorearon mínimo 3 iones por compuesto en modo SIM (22).

#### Potencial de movilidad de los plaguicidas hacia aguas superficiales

El potencial de movilidad de los plaguicidas en estudio hacia aguas superficiales, se estableció por medio del *Pesticide Impact Rating Index* (PIRI). Para esta evaluación, el índice considera las diferentes caracte-

rísticas ambientales de la región de estudio tales como el tipo de suelo, contenido de materia orgánica del suelo, pendiente del terreno, temperatura de la zona e información pluviométrica. A diferencia de otros índices ambientales el PIRI también considera las diferentes zonas dentro del perfil del suelo, los cambios en el contenido de carbono orgánico, densidad de la población microbiana y decrecimiento de la actividad microbiológica con respecto al perfil del suelo (23).

La evaluación de movilidad de los plaguicidas se realizó en dos parcelas cultivadas con cebolla larga que presentaban características geográficas diferentes. Uno de ellas se encontraba ubicada en un terreno con pendiente de aproximadamente 30°, adyacente a la corriente "Las Cintas", y la otra estaba ubicada en un terreno plano a orillas del Lago de Tota. La Tabla 4 muestra los parámetros característicos de cada parcela.

**Tabla 5.** Plaguicidas encontrados en aguas superficiales en las estaciones de muestreo.

Campaña de muestreo	Estación de muestreo	Concentración del plaguicida encontrado (ng/ L)
2	3	Tebuconazol < LC <sup>a</sup>
3	3, 4, 6	Malatión < LC <sup>b</sup>
5	3	Malatión < LC
6	6	Malatión < LC
	2	Clorotalonilo < LC <sup>c</sup>
7	2	Clorotalonilo < LC
	3, 4	Malatión < LC
	5	Malatión 69,9
	3	Difenoconazol 80,4
	4	Difenoconazol < LC <sup>d</sup>
	5	Difenoconazol 114,9
	5	Tebuconazol 179,3

<sup>a</sup> Tebuconazol LC=102,95 ng/L; <sup>b</sup> Malatión LC= 40,35 ng/L; <sup>c</sup> Clorotalonilo LC=16,05 ng/ L, <sup>d</sup> Difenoconazol LC=13,95 ng/L.

## Resultados y discusión

### Plaguicidas en aguas superficiales

La Tabla 5 muestra los resultados encontrados en las muestras de aguas superficiales, la mayoría de las muestras presentaron concentraciones por debajo del límite de cuantificación. Los resultados reportados como <LC indican la presencia del plaguicida en las muestras, las cuales fueron confirmadas por CG/EM. En sólo dos muestras las concentraciones encontradas estuvieron por encima del límite de cuantificación de la metodología (muestras 4 y 5 de la campaña de muestreo 7). El plaguicida malatión se encontró en el 16,7% de las muestras analizadas, difenoconazol en 14,2%, tebuconazol en 4,8% y clorotalonilo en 4,8%.

La frecuencia de detección de malatión en las muestras puede deberse a las propiedades fisicoquímicas del agua de la corriente las cintas, ya que se encontró un pH entre 6,2 y 6,8, lo cual favorece la estabilidad de este plaguicida, pues se ha reportado que la cinética de hidrólisis de malatión es mayor en medio alcalino. Adicionalmente, al observar la Tabla 1, se encuentra que esta molécula es de los plaguicidas que más se usan en la región, lo cual aumenta su probabilidad de detección.

Estos resultados correlacionan satisfactoriamente con lo reportado en estudios similares, en los cuales se ha encontrado en repetidas ocasiones la presencia de este compuesto en aguas superficiales (24-27). De acuerdo a la US-EPA, concentraciones de malatión por debajo de 0,1 g/L, no presentan toxicidad para la vida acuática de la región (28). Respecto a la detección de clorotalonilo, se encuentra que al igual que el

malatión las condiciones ambientales favorecen la estabilidad del compuesto, pues para este plaguicida se ha reportado un tiempo de vida media por hidrólisis de 31 días a un pH 9, así como una descomposición por fotólisis de 65 días (29). Por otro lado, la movilidad de este plaguicida hacia el agua puede deberse a fenómenos de escorrentía, pues su constante de adsorción es relativamente alta (300-7000 mL/g) (30). De igual manera que lo reportado para el malatión, la presencia de clorotalonilo en aguas superficiales se ha encontrado frecuentemente (31).

Como se observa en la Tabla 5, la detección de compuestos de la familia de los azoles (difenoconazol y tebuconazol) fue la más alta respecto a las demás familias de plaguicidas; la presencia de estos compuestos en agua puede obedecer a diferentes mecanismos de transporte, aunque debido a sus altas capacidades de adsorción en el suelo (Koc 992 L/kg y 3760 L/kg, respectivamente) (29), se cree que la erosión hídrica superficial puede arrastrar las partículas de suelo en las que se encuentran adsorbidos estos plaguicidas y, de esta manera, estos compuestos pueden llegar hasta las corrientes de agua superficial (32). Cabe resaltar en la Tabla 1 que las dosis utilizadas para tebuconazol son de las más altas respecto a los demás plaguicidas utilizados.

La Figura 2 muestra que durante el período de muestreo se observaron precipitaciones intensas, las cuales pueden causar la erosión de los terrenos produciendo el arrastre de las partículas del suelo hacia los canales de agua y por tanto aumentando la escorrentía. Dado que los plaguicidas se encuentran adsorbidos a las partículas del suelo estos se transportan hacia aguas superficiales presentando sedimentación y posterior resuspensión de las partículas en el agua. Este hecho ha sido evidenciado por Schaffer *et al.* (33) y Schriever *et al.* (34) quienes encontraron tebuconazol en aguas superficiales y en aguas de escorrentía respectivamente.

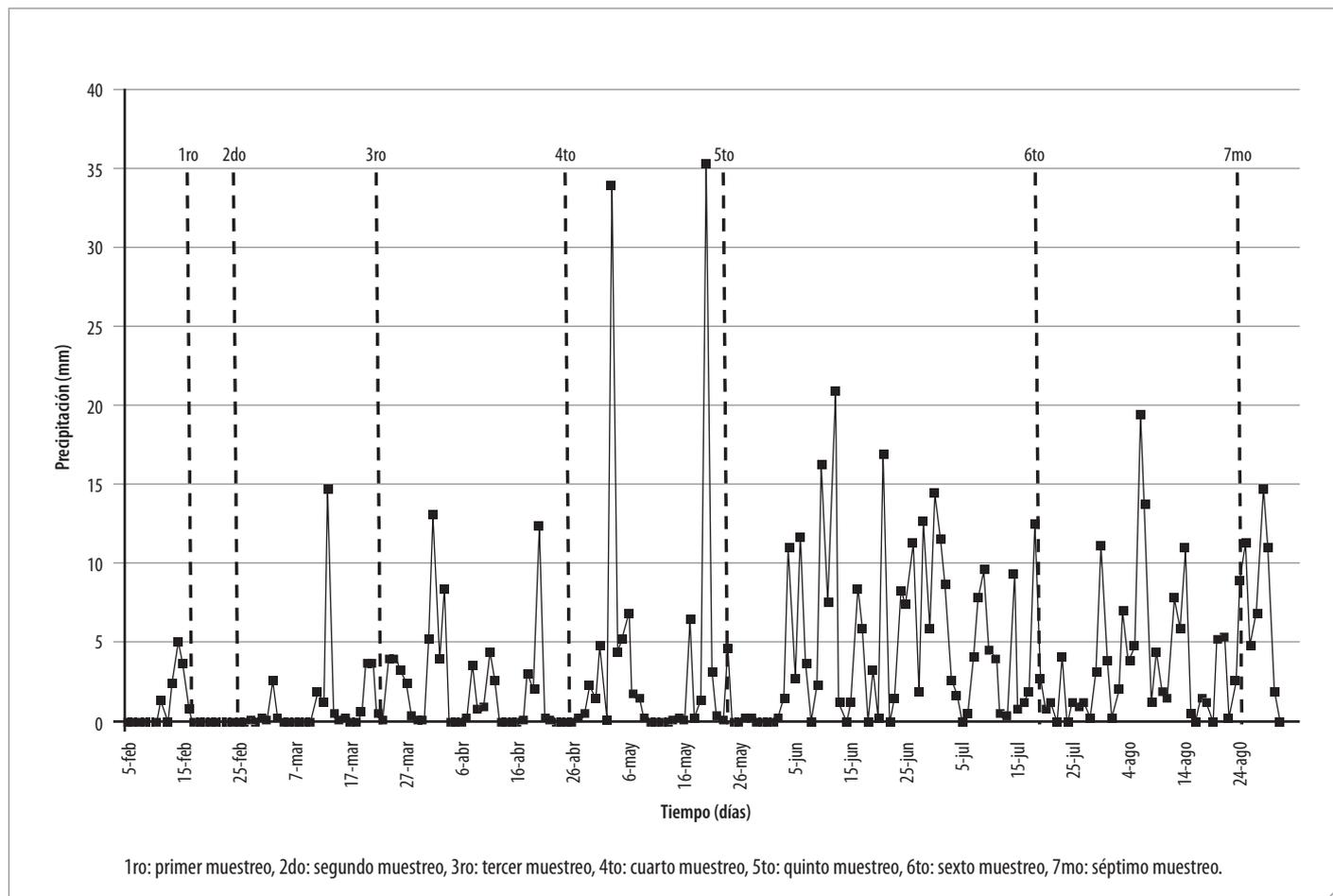


Figura 2. Precipitaciones durante las campañas de muestreo.

**Tabla 6.** Partición de tebuconazol y difenoconazol en agua y sedimentos transportados por escorrentía.

Pérdidas de plaguicidas	Tebuconazol	Difenoconazol
% Pérdidas por escorrentía en agua	0,02	0,03
% Pérdidas por escorrentía en sedimentos	0,03	1,69
% Pérdida total	0,05	1,72

### Parcela de escorrentía

Con el propósito de evaluar de una manera más adecuada el movimiento de los plaguicidas que se aplican en el cultivo de cebolla hacia el lago de Tota, se llevó a cabo un experimento que buscaba estimar la cantidad de plaguicida que es transportado por escorrentía superficial (producida por eventos de lluvia), en un área y período de tiempo establecidos, una vez los plaguicidas son aplicados.

Para realizar este estudio, se escogieron los plaguicidas tebuconazol y difenoconazol, los cuales como se observa en la Tabla 5 fueron frecuentemente detectados y que además se ha reportado que su movilidad hacia cuerpos de agua se produce principalmente por este mecanismo de transporte (32). Los análisis de las muestras, sobre los sólidos sedimentables y el agua recolectada indicaron que tebuconazol y difenoconazol se encontraban a una concentración de 4800 ng/L y 330 ng/L, respectivamente. En sólidos suspendidos tebuconazol se encontró a una concentración de 6,3 mg/kg y difenoconazol a una concentración de 7,3 mg/kg.

De otra parte, se calculó la fracción de compuesto que se transportó a través de fenómenos de escorrentía o erosión (porcentaje pérdida) para cada uno de los plaguicidas, lo cual se realizó a través de los resultados obtenidos de los análisis de sólidos suspendidos y del agua recolectada, así como de la cantidad de plaguicida aplicada en la parcela que se diseñó (ver atrás). La Tabla 6 muestra los resultados del cálculo de esta pérdida de plaguicidas por fenómenos de escorrentía. Se puede observar que las pérdidas son similares en agua y sedimentos para tebuconazol, mientras que para difenoconazol se presentan mayores pérdidas en sedimentos. Este hecho se atribuye a la mayor solubilidad del tebuconazol en agua y al mayor valor de la constante de adsorción ( $K_{oc}$ ) del difenoconazol (3760 L/kg) respecto a la del tebuconazol (992 L/kg).

A pesar de que la cantidad de tebuconazol aplicada (1 kg/ha) a la parcela cultivada, es mayor que la cantidad de difenoconazol (0,05 kg/ha), se presenta una mayor pérdida por escorrentía para este último, donde las pérdidas se encuentran asociadas a sedimentos, por lo que es posible establecer que la erosión hídrica del terreno es un factor influyente para el transporte de difenoconazol hacia aguas superficiales. Algunos autores han reportado un máximo de pérdidas del 2% para plaguicidas debidas a fenómenos de escorrentía (13).

### Plaguicidas encontrados en sólidos sedimentables en la corriente "Las cintas"

La Tabla 7 muestra los resultados de las muestras de sólidos sedimentables tomadas en la corriente "Las Cintas"; en esta tabla se observa que se determinó la presencia de malatión y clorotalonilo.

La presencia de malatión en sedimentos ha sido reportada por otros autores en sistemas hídricos de características similares, en estos estudios se encontraron concentraciones entre 0,8 mg/kg y 36 mg/kg (35, 36). Por otro lado, Varca *et al.* reportaron que en Laguna de Bay (Filipinas), el malatión se transporta desde el lugar de aplicación a cuerpos de agua a través de sedimentos de tamaño de partículas <1,2  $\mu$ m (37).

De esta manera, al observar los resultados presentados en la Tabla 7, se encuentra que las concentraciones encontradas en el presente estudio, son superiores a lo reportado en literatura, por lo que es probable que el malatión se adsorba a los sólidos suspendidos del agua, a

través de interacciones lipofílicas con la materia orgánica. Por lo tanto, el malatión podría moverse hacia aguas superficiales por medio de la adsorción a los sedimentos. El potencial de los sedimentos para adsorber contaminantes orgánicos ha sido demostrado por varios investigadores (38, 39). La preferencia de los contaminantes por los sedimentos en suspensión se debe a la gran área superficial que estos presentan y al contenido de carbono orgánico.

Debido a su relativamente alta constante de adsorción (850 L/kg), la presencia de clorotalonilo en sólidos sedimentables era de esperarse pues esta propiedad le permite al plaguicida adsorberse al material particulado que proviene de la erosión del suelo y que llega a aguas superficiales para finalmente depositarse a manera de sólidos suspendidos.

### Potencial de movilidad de los plaguicidas hacia aguas superficiales

Se determinó el potencial de movilidad de los plaguicidas encontrados en la corriente "Las Cintas" hacia aguas superficiales por medio del índice PIRI. Se encontró que tebuconazol, clorotalonilo y malatión presentan un muy alto riesgo de movilidad hacia aguas superficiales, mientras que el riesgo para difenoconazol es alto; esto indica que dependiendo de las condiciones ambientales y las aplicaciones de los principios activos que se realizan en la zona de estudio, se presenta una alta probabilidad de encontrar estos compuestos en aguas superficiales. Lo anterior coincide con las determinaciones analíticas realizadas en las muestras de agua superficial de la corriente "Las Cintas". De esta manera, se evidencia la residualidad de estos compuestos en aguas superficiales de la cuenca del Lago de Tota.

### Conclusiones

Se encontró la presencia de los plaguicidas malatión, difenoconazol, tebuconazol y clorotalonilo en aguas superficiales de la cuenca del Lago de Tota, en la mayoría de las muestras analizadas las concentraciones se encontraron por debajo del límite de cuantificación. A pesar de las bajas concentraciones de los plaguicidas encontrados en aguas superficiales, el flujo permanente de la corriente hacia el lago puede arrastrar cantidades de plaguicidas que serían representativas en los sedimentos del lago.

**Tabla 7.** Plaguicidas en muestras de sólidos sedimentables.

Campaña de muestreo N°	Plaguicidas	
	Malatión(mg/ kg)	Clorotalonilo (mg/ kg)
3	4,38	1,29
4	1,90	N.D. <sup>a</sup>
5	N.D. <sup>a</sup>	0,27
7	3,65	0,40

<sup>a</sup> N.D.= No detectado.

El transporte de difenoconazol y tebuconazol hacia aguas superficiales se podría explicar por el arrastre de partículas de suelo y por la erosión de los terrenos ya que estos plaguicidas se retienen en las partículas del suelo debido al alto valor de la constante de adsorción ( $K_{oc}$ ) y a su baja solubilidad en agua.

## Agradecimientos

Agradecemos al Laboratorio de Suelos del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, por su asesoría y al apoyo de la Agencia Internacional de Energía Atómica (OIEA).

## Referencias

- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Colombia. 2014. Disponible en: <http://www.dane.gov.co/index.php/comercio-externo/exportaciones>. [Consultado en marzo de 2014].
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Colombia. 2014. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getdoc/1908eb2c-254f-44de-8e21-c322cc2a7e91/Estadisticas.aspx>. [Consultado en abril de 2014].
- Martínez, H. Plan de Ordenación y Manejo de la Cuenca del Lago de Tota. Bogotá D.C.: CorpoBoyacá - Pontificia Universidad Javeriana. pp. 126-150. 2006.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) - Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia. Primer censo del cultivo de cebolla larga. 2001. Disponible en: [http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/ena/Cebolla\\_Boyaca\\_Reg\\_Laguna\\_Tota.pdf](http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/ena/Cebolla_Boyaca_Reg_Laguna_Tota.pdf). [Consultado en marzo de 2014].
- Corpoica - Asohorfrucol. La cebolla de rama (*Allium fistulosum*) y su cultivo. Colombia. 2004. Disponible en: <http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Publicaciones/LacebolladeramaAlliumfistulosumycultivo.pdf>. [Consultado en marzo de 2014].
- Manahan, S. E. Environmental Science, Technology, and Chemistry - Environmental Chemistry. Boca Raton (Florida, USA): CRC Press LLC. 2000.
- Holvoet, K. M.; Seuntjens, P.; Vanrolleghem, P. A. Monitoring and modeling pesticide fate in surface waters at the catchment scale. *Ecol. Model.* 2007. **209**: 53-64.
- Schlotz, T. F. Modelling of the long-term fate of pesticides residues in agricultural soils and their surfaces exchange with the atmosphere. *Sci Total Environ.* 2006. **368**: 823-838.
- Kookana, R. S.; Miller, R. B. Pesticide impact rating index - a pesticide risk indicator for water quality. *Water Air Soil Poll.* 2005. **5**: 45-65.
- Cañón, J. E.; Rodríguez, C. O. Balance hídrico del Lago de Tota. En: XV Seminario Nacional de Agua e Hidrología. Universidad Nacional de Colombia - Sociedad Colombiana de Ingenieros, Bogotá, 2002.
- González, A. D.; Aranguren, N. J.; Gaviria, S. Cambios en la estructura de la población de *Boeckella gracilis* en el plancton del Lago de Tota, Boyacá, Colombia. *Acta Biol Colomb.* 2008. **13**: 61-71.
- Cordero, R. D.; Ruiz, J. E.; Vargas E. F. Spatial-temporal determination of phosphorous concentration in lake of Tota. *Rev Colomb Quim.* 2005. **34**: 211-218.
- Martínez-Cordón, M. J. Comportamiento de herbicidas en suelos de olivar: simazina y terbutilazina. Tesis de doctorado. Universidad de Córdoba. Departamento de Química Agrícola y Edafología. Córdoba (España). 2005.
- Liess, M.; Schulz, R.; Liess, M. H. D.; Brother, B.; Kreuzig, R. Determination of insecticide contamination in agricultural headwater streams. *Water Res.* 1999. **33**: 239-247.
- Jergentz, S. Training workshop on environmental toxicology FAO/IAEA in field sampling. Vienna (Austria). 2007.
- International Atomic Energy Agency (IAEA). Training workshop on methodologies for the pesticides extraction. Vienna (Austria). 2007.
- United States Environmental Protective Agency (EPA). Method 527: Determination of selected pesticides and flame retardants in drinking water by solid phase extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). EPA Document No. 815-R-05-005. United States of America. 2013. Disponible en: <http://www.epa.gov/ogwdw/methods/pdfs/methods/met527.pdf>. [Consultado en marzo de 2014].
- Mojica A.; Guerrero, J. A. Extraction procedure for pesticide analysis in soil. 2<sup>nd</sup> Latin American Pesticide Residue Workshop. Food and Environment. Santa Fe (Argentina). 2009.
- Corley, J. Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. En: Handbook of residue analytical methods for agrochemicals. Lee, P. W. (editor). Chichester (West Sussex, England): Wiley & Sons. pp. 59-75. 2003.
- Ahumada D.; Guerrero, J. Estudio del efecto matriz en el análisis de plaguicidas por cromatografía de gases. *Vitae.* 2010. **17**(1): 51-58.
- Ahumada D.; Guerrero, J. Optimización del inyector de temperatura programada en el análisis de residuos de plaguicidas mediante el método simplex. *Rev Colomb Quim.* 2010. **39**(2): 221-236.
- SANCO 10684. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2009. Disponible en: [http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance\\_Sanco\\_2009\\_10684.pdf](http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2009_10684.pdf). [Consultado en marzo de 2014].
- Kookana, R. S.; Miller, R. B. Pesticide impact rating index - a pesticide risk indicator for water quality. *Water Air Soil Poll.* 2005. **5**: 45-65.
- Vryzas, Z.; Vassiliou, G.; Alexoudis, C.; Papadopoulou-Mourkidou, E. Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece. *Water Res.* 2009. **43**: 1-10.
- Sujatha, C. H.; Nair, S. M. Determination and distribution of endosulfan and malathion in an Indian estuary. *Water Res.* 1999. **33**: 109-114.
- Abdel-Halim, K. Y.; Salama, A. K.; El-khateeb, E. N.; Bakry, N. M. Organophosphorus pollutants (OPP) in aquatic environment at Damietta Governorate, Egypt: Implications for monitoring and biomarker response. *Chemosphere.* 2006. **63**: 1491-1498.
- Kuster, M.; López de Alda, M. J.; Barata, C.; Raldúa, D.; Barceló, D. Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2008. **75**: 390-401.
- United States Environmental Protective Agency (EPA). National recommended water quality criteria. United States. 2013. Disponible en: <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/current/index.cfm#nonpriority>. [Consultado en marzo de 2014].
- University of Hertfordshire. PPDB: Pesticide Properties Data Base. England. 2011. Disponible en: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>. [Consultado en marzo de 2014].
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Resolución 0806. Colombia. 2013. [http://www.minambiente.gov.co/documentos/res\\_0806\\_290410.pdf](http://www.minambiente.gov.co/documentos/res_0806_290410.pdf). [Consultado el 15 de febrero de 2013].
- Chaves, A.; Shea, D.; Cope, W. G. Environmental fate of chlorothalonil in a Costa Rica banana plantation. *Chemosphere.* 2007. **69**: 1166-1174.
- Martínez-Cordón, M. J.; Guerrero, J. A.; Mosquera, C. S. <sup>14</sup>C tebuconazole degradation in Colombian soils. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 2010. **75**: 173-81.
- Schäfer, R. B. P.; Vrana, B.; Mueller, R.; Liess, M. Performance of the Chemcatcher passive sampler when used to monitor 10 polar and semi-polar pesticides in 16 Central European streams, and comparison with two other sampling methods. *Water Res.* 2008. **4**: 2707-2717.

34. Schriever, C. A.; Von Der Ohe, P. C.; Liess, M. Estimating pesticide runoff in small streams. *Chemosphere*. 2007. **68**: 2161-2171.
35. Sapozhnikova, Y.; Bawardi, O.; Schlenk D. Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. *Chemosphere*. 2004. **6**: 797-809.
36. Long, J.L.A.; Parker, A.; Rae, J.E. (1998). Micro-organic compounds associated with sediments in the Humber rivers. *Sci. Total Environ*. **210**: 229-253.
37. Varca, L. M. (2012). Pesticide residues in surface waters of Pagsanjan-Lumban catchment of laguna de Bay, Philippines. *Agr. Water Manage*. **106**: 35-40.
38. Katagi T. Behavior of pesticides in water-sediments systems. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2004. **187**: 133-251.
39. Avnimelech, Y.; Mc Henry, J. R. Enrichment of transported sediments with organic carbon, nutrients and clay. *Soil Sci Soc Am J*. 2004. **48**: 259-266.

**Article citation:**

Mojica, A.; Guerrero, J. A. Evaluación del movimiento de plaguicidas hacia la cuenca del Lago de Tota, Colombia. *Rev Colomb Quim*. 2013. **42**(2): 29-38.

## Residuos de plaguicidas en cultivos de pasifloras en regiones de alta producción en Colombia

### Resumen

Colombia cuenta con una gran diversidad de frutas tropicales las cuales se han venido posicionando en los mercados internacionales, entre ellas las pasifloras. Para que la producción de estos cultivos responda al aumento de la demanda nacional y de exportación, se aplican plaguicidas para el control de plagas y enfermedades. El uso inadecuado de estos agroquímicos puede implicar riesgos para la salud pública, contaminación ambiental e interferir con el comercio internacional. Con el objetivo de conocer las prácticas agrícolas y el manejo integrado de plagas, relacionado con el uso de plaguicidas, se realizaron encuestas a productores de tres especies de pasifloras (maracuyá, gulupa y granadilla) en los principales municipios productores de Colombia. Se realizó un muestreo aleatorio y se analizaron muestras por el método IAEA-QuEChERS validado en el laboratorio. Según los resultados de las encuestas y los análisis de laboratorio se constató la presencia de residuos de plaguicidas que sobrepasan los límites máximos de residuos en algunas muestras; así mismo, que los plaguicidas identificados corresponden con los aplicados por los agricultores. Se identificó que la presencia de residuos se debe principalmente a falencias en la aplicación de productos agrícolas no registrados para dichos cultivos.

## Pesticides residues in Passifloras crops in Colombian high production regions

### Abstract

As one of the most bio-diverse countries in the world, Colombia boasts a wide diversity of highly palatable tropical fruits. Even though Colombian fruit production has primarily targeted the domestic market, several fruit species, such as passion fruit, are steadily gaining ground in the broader international arena. Many Colombian small-scale farmers use pesticides for pest and disease control, in order to increase crop's production to respond to domestic and international raising of demand. Inadequate use of pesticides could possibly entail public health risks, environmental contamination and ultimately interfere with international trade. Surveys were carried out to producers of three species of passiflora crops (yellow passion fruit, sweet passion fruit and purple passion fruit) from the largest producers municipalities in Colombia. Randomly sampling was realized and samples were analyzed by multiresidue analysis methodology validated in the laboratory and based on IAEA-QuEChERS method. With the results of survey and laboratory analysis it is showed the presence of pesticide residues that exceed maximum residue limits in some samples and the pesticides identified in the samples correspond to those used by farmers. It was found that the presence of residues is mainly due to shortcomings in application of agricultural products not registered for such crops.

## Resíduos em culturas passiflora nas regiões de produção elevadas em Colombia

### Resumo

A Colômbia tem uma grande variedade de frutas tropicais que foram posicionamento nos mercados internacionais, incluindo Passiflora. Para a produção dessas culturas responder à crescente demanda interna e exportação, aplicar pesticidas para controle de pragas e doenças. O uso inadequado destes produtos químicos podem envolver riscos para a saúde pública, a contaminação ambiental e interferir com o comércio internacional. A fim de atender as práticas agrícolas e manejo integrado de pragas relacionadas a pesquisas de utilização de pesticidas para produtores de três espécies de Passiflora, maracujá e paixão gulupa fruto em grandes municípios produtores na Colômbia. A amostragem aleatória foi realizada e as amostras foram analisadas pelo método IAEA-QuEChERS desenvolvido no nosso laboratório. De acordo com os resultados de pesquisas e análises de laboratório mostraram a presença de resíduos de pesticidas que excedem os limites máximos de resíduos em algumas amostras e os pesticidas identificados nas amostras correspondem aos utilizados pelos agricultores. Verificou-se que a presença de resíduos é principalmente devido às deficiências no uso adequado de práticas agrícolas relacionadas principalmente com a implementação de produtos agrícolas não registrados para essas culturas.

**Palabras clave:** residuos de plaguicidas, prácticas agrícolas, pasifloras, cromatografía de gases.

**Keywords:** Pesticides, agricultural practices, passiflora, gas chromatography.

**Palavras-chave:** pesticidas, práticas agrícolas, pasifloras, cromatografia em fase gasosa.

## Introducción

COLOMBIA ES UN PAÍS AGRÍCOLA y privilegiado por la variedad de climas que posee. En los últimos años, el sector agrícola ha experimentado un proceso de apertura económica que le ha permitido innovar y buscar altos niveles de calidad, los cuales se traducen en competitividad en diferentes mercados.

Algunos productos, como las frutas exóticas, han alcanzado gran importancia a nivel nacional e internacional; un ejemplo bastante notorio lo comprenden las 'frutas de la pasión' pertenecientes a la familia *Passifloraceae*, que han tenido bastante acogida por los productores de la región andina. Colombia es un importante productor de varias especies de pasifloras, ya que cuenta con condiciones bio-físicas apropiadas para diversificar su oferta y aumentar los niveles de producción (1).

En los últimos años ha habido un incremento importante de cultivos de pasifloras. En reportes del año 2008, la producción de granadilla fue de 52305 toneladas con un área de 4568 hectáreas cultivadas. Para maracuyá se encontró una producción de 109486 toneladas, con 6372 hectáreas cultivadas, siendo los departamentos más destacados Huila, Cundinamarca y Boyacá (2). Durante el 2012, la gulupa fue la segunda fruta más vendida en mercados internacionales con USD \$12 millones seguida por la granadilla con USD \$2,9 millones (3,4,5).

Los problemas fitosanitarios asociados con los cultivos de *Passifloraceae* son los principales factores que inciden en la disminución de la producción, ya que pueden causar pérdidas entre 30 y 40%. Los cultivos padecen altos niveles de infestación de plagas y enfermedades, ante los cuales comúnmente no se adoptan estrategias de manejo eficientes, rentables y ambientalmente amigables. Aunque algunos productores implementan buenas prácticas agrícolas en estos cultivos, éstos no constituyen una mayoría y no se cuenta con estudios de inocuidad respecto a los residuos de plaguicidas.

En Colombia se destacan tres regiones con alta producción de gulupa, granadilla y maracuyá: los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Huila. En estas zonas el control de plagas se realiza por medio de aplicación de plaguicidas. El uso de insecticidas es la opción de control de plagas más popular pues el 90,5% de los productores de pasifloras hacen uso de esta práctica (6).

De acuerdo con legislaciones internacionales, es indispensable asegurar la inocuidad del producto como requerimiento para exportación, y por tanto, es necesario realizar análisis de residuos de plaguicidas como parámetro de control. Tal información es muy importante para evaluar la eficacia de las prácticas agrícolas llevadas a cabo por los agricultores y para promover la utilización y el uso adecuado de los plaguicidas.

En vista de la alta dependencia de los productores de pasifloras respecto del uso de insecticidas, implementar protocolos de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) ofrece ventajas, tanto a productores, como a consumidores, pues al suministrar productos inocuos, se generará en el mercado un ambiente de confianza y las frutas de exportación cumplirán con las exigencias respecto a límites máximos de residuos.

El objetivo del presente trabajo consistió en la determinación de residuos de plaguicidas en el fruto entero de tres especies de pasifloras en cultivos pertenecientes a los principales municipios productores de Colombia en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca y Huila, con el fin de evaluar las prácticas agrícolas relacionadas con el manejo de plaguicidas, ya que ello se constituye como requerimiento clave para la comercialización a nivel nacional e internacional.

## Materiales y métodos

### Área de estudio

Se realizó una encuesta a productores de pasifloras, cuyo objetivo fue recolectar información sobre las prácticas agrícolas implementadas en los cultivos. Las especies estudiadas fueron: *Passiflora edulis f. flavicarpa* (maracuyá), *P. edulis f. edulis* (gulupa) y *P. ligularis* (granadilla). La población encuestada incluyó 48 fincas en los municipios con mayor producción de pasifloras en Colombia, específicamente en los departamentos de Huila, Boyacá y Cundinamarca. La información a recopilar se enfocó en el manejo integrado de plagas y el método para obtener la información fue mediante entrevistas y verificación de registros.

### Prácticas agrícolas en cultivos de pasifloras

Las BPA ofrecen un ambiente propicio para que la agricultura sea económicamente viable y, por tanto, sostenible; generan bienestar social en los grupos de agricultores y trabajadores y, en última instancia, originan beneficios para los consumidores. Así, las BPA establecen un equilibrio óptimo entre metas económicas, ambientales y sociales (7).

En Colombia se ha puesto en marcha un plan nacional para la implementación de BPA en diferentes cultivos prioritarios, como las pasifloras. El principal objetivo es impulsar el acceso a mercados globalizados a partir de capacitación en buenas prácticas agrícolas (BPA). Con ello se promueve el manejo integrado de plagas y desarrollo de BPA en los cultivos de maracuyá, gulupa y granadilla (8).

Los esfuerzos por lograr una garantía de la calidad, la satisfacción del consumidor y la producción de alimentos inocuos con alta aceptación, han conducido a la creación de normas y procedimientos armonizados a nivel mundial para desarrollar las BPA; un ejemplo son las normas GLOBALGAP que cubren toda la etapa de producción e incluyen las aplicaciones de agroquímicos (9). En la sección correspondiente se puede verificar, entre otros aspectos, el relacionado con los análisis de residuos de plaguicidas, que sin duda son un resultado global del manejo agrícola realizado para el cultivo en términos de uso de estas sustancias. De acuerdo con los resultados de los análisis se puede constatar si el manejo integrado de plagas, y por tanto las BPA, se están llevando de una manera adecuada; además, si los productos cumplen con las características de inocuidad exigidas por los entes de control.

### Muestreo

En la selección de las muestras para análisis de residuos de plaguicidas se realizó un muestreo aleatorio en 18 de las fincas encuestadas (en todo el cultivo y en toda la planta), 6 por especie. Las especies de pasifloras recolectadas fueron gulupa, granadilla y maracuyá. La cantidad de muestra recolectada osciló entre 1,5-2,0 kg de la fruta comerciable en el momento de la cosecha. Se tomaron dos muestras por cada finca. Cada muestra se empacó en bolsas plásticas y se etiquetó con la siguiente información: municipio, vereda, posición geográfica, fecha de última aplicación y tipo de cultivo. En la Tabla 1 se presenta la información correspondiente a las muestras tomadas en zonas del Departamento del Huila donde se cultiva maracuyá.

**Tabla 1.** Información sobre el muestreo de maracuyá en el Departamento del Huila.

Productor	Municipio	Vereda	Ubicación	Tiempo entre la última aplicación y el muestreo
7	Suaza	Satia	01°57'13"N 01°48'05" W 976 m	7 días
8	Suaza	Satia	01°56'45"N 075°48'21" W 1038 m	11 días
9	Suaza	Satia	01°55'44"N 075°47'44" W 1026 m	8 días
10	Suaza	Satia	01°58'11"N 075°47'50" W 973 m	8 días
11	Gigante	Rio Loro	02°18'50"N 075°36'39" W 975 m	8 días
12	Gigante	Rio Loro	02°19'25"N 075°36'40" W 759 m	4 días

### Materiales de referencia, reactivos y soluciones

Los estándares de plaguicidas empleados en este trabajo fueron obtenidos de Dr. Ehrenstorfer y de Chemservice, cada uno de éstos con una pureza superior al 95%. Las soluciones madre fueron preparadas a concentraciones cercanas a 500 µg/mL en acetato de etilo y fueron almacenadas en frascos ámbar a -20 °C. La mezcla de plaguicidas se preparó en acetato de etilo tomando diferentes volúmenes de cada una de las soluciones madre hasta obtener las concentraciones de trabajo; éstas se almacenaron en frascos ámbar a -20 °C. Todos los solventes empleados en este estudio fueron J.T. Baker grado residuos.

### Metodología de extracción y limpieza

Se implementó la metodología IAEA-QuEChERS, la cual consiste en una extracción con acetato de etilo y posterior limpieza en fase dispersiva (10). En la Figura 1 se describe esta metodología. Previamente al proceso de extracción y limpieza se homogeneizaron 2,0 kg de muestra en un Stephan Blender 2010.

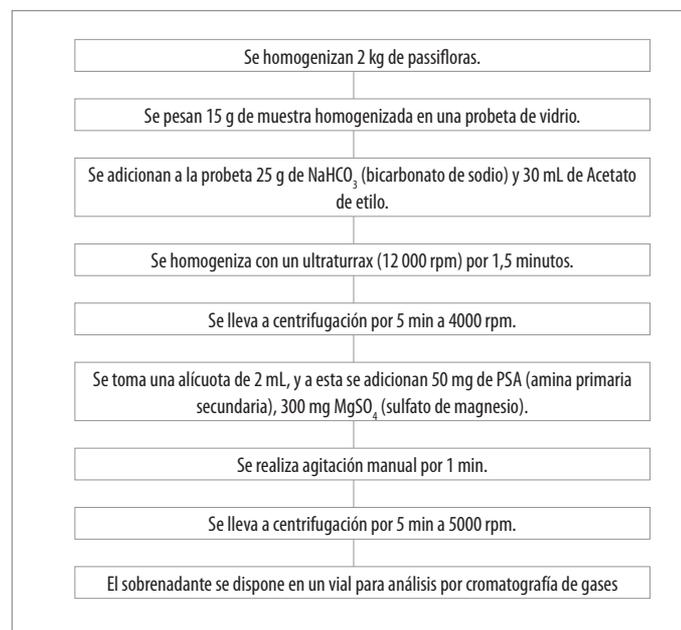
### Instrumentos y equipos

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies' HP7890A, acoplado a un detector selectivo de masas 5975C (Palo Alto, CA, EUA). El cromatógrafo se encontraba equipado con un inyector automático 7673 con control electrónico de presión y un inyector de temperatura programada, el cual se encontraba conectado a una columna capilar HP-5 MS (30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm).

El inyector se optimizó en modo venteo de solvente bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 39,4 °C; presión en el inyector luego de la transferencia a la columna, 1,54 bares; flujo de purga de la septa, 3 mL/min; presión durante el venteo, 0 bares por 0,5 min; flujo de venteo, 63,8 mL/min. El programa de temperatura del inyector fue

el siguiente: 39,4 °C por 0,53 min; luego se incrementó la temperatura a razón de 625 °C/min hasta 267,3 °C y se mantuvo en este valor por 2,8 min; a continuación se llevó a 290 °C a razón de 100 °C /min y se mantuvo a esta temperatura hasta el final del análisis cromatográfico. El volumen de inyección fue de 4 µL.

El espectrómetro de masas procesó los datos en modo SIM/SCAN y comenzó a adquirir 8,50 min después de la inyección, la temperatura de la fuente de ionización fue de 203 °C, la temperatura del cuádrupolo fue de 150 °C, la energía de ionización fue 70 eV y la presión en el orden de  $1,33 \times 10^{-5}$  bares.

**Figura 1.** Descripción de la metodología IAEA-QuEChERS para el análisis de residuos de plaguicidas en muestras de pasifloras.

**Tabla 2.** Grupo de iones adquiridos por el detector selectivo de masas para confirmación de los plaguicidas analizados en pasifloras.

No	Plaguicida	t <sub>r</sub>	Ión de cuantificación	Q1	Q2	Q3
1	Metamidofos	9,669	94	95	141	-
2	Monocrotofos	15,908	127	192	223	-
3	Carbofuran	16,802	164	149	221	-
4	Clorotalonil	18,663	266	264	268	-
5	Pirimetanil	17,832	198	199	200	197
6	Metil paration	19,972	263	125	246	-
7	Malation	21,920	173	158	125	127
8	Clorpirifos	22,572	314	316	258	260
9	Profenofos	26,668	337	339	373	372
10	Tebuconazol	29,851	250	252	125	163
11	Tetradifon	31,422	356	354	358	227
12	λ-Cihalotrina	32,051	181	197	449	161
13	Cipermetrina	35,244	163	165	181	209
14	Difenoconazol	38,594	323	325	265	267
15	Deltametrina	39,573	253	181	251	255
16	Azoxistrobin	40,529	344	388	403	-

El programa de temperatura del horno fue el siguiente: al inicio se mantuvo a 41 °C por 3,67 minutos y luego se incrementó a 60 °C a una razón de 115 °C/min; tan pronto alcanzó esta temperatura se llevó a 150 °C a razón de 20 °C/min, luego se llevó a 195 °C a 5 °C/min, y se mantuvo a esta temperatura por 5 minutos. Por último se llevó hasta 280 °C a una razón de 10 °C/min, manteniendo el horno a 280 °C por 12 minutos más. El tiempo total de análisis cromatográfico fue 42,8 minutos.

La determinación y confirmación de los plaguicidas se realizó mediante la técnica de adquisición Monitoreo Selectivo de Iones (SIM). La selección de los iones para la adquisición por modo SIM fue realizada teniendo en cuenta la abundancia relativa de los fragmentos, con el fin de tener una respuesta adecuada y una buena especificidad y selectividad. Para la mayoría de los compuestos se seleccionaron 4 iones: uno para cuantificación y 3 cualificadores. En la Tabla 2 se muestran los iones seleccionados para cada plaguicida.

### Validación de la metodología

Con el objetivo de obtener resultados confiables, reproducibles y adecuados para la determinación de residuos de plaguicidas en pasifloras, se validó la metodología para los plaguicidas que aplican los agricultores en los cultivos y que se podían determinar por GC/MS. Siguiendo los parámetros de la guía SANCO 2011 (11) se determinó: especificidad/selectividad, precisión, límites de detección y cuantificación, linealidad y exactitud. La Tabla 3 presenta los porcentajes de recuperación a 3 niveles de concentración, límites de detección, límites de cuantificación y precisión, como precisión intermedia de los plaguicidas evaluados. Como se observa, el metamidofos es el único plaguicida que no cumple con los criterios de exactitud de SANCO en los que el porcentaje de recuperación debe estar entre 70 y 120%; sin embargo, los resultados son precisos pues el %CV está por debajo del 20%. Las curvas de calibración se prepararon en blanco de matriz para minimizar el error en la determinación debido al efecto matriz (12).

## Resultados y discusión

### Uso de plaguicidas

Algunos aspectos de los procedimientos GLOBALGAP se consideraron en la encuesta y se destinaron a conocer el estado de las prácticas agrícolas en el manejo de los cultivos de pasifloras en las regiones de mayor producción. Dichos aspectos se trataron mediante preguntas sencillas y se enfocaron principalmente en manejo integrado de plagas, medio ambiente y conservación, en disposición de envases vacíos de productos fitosanitarios, salud, seguridad y bienestar del trabajador.

Se estableció que la aplicación de plaguicidas se lleva a cabo mediante el uso de bomba de espalda durante la etapa de floración y de bomba estacionaria durante la etapa de producción. El agricultor generalmente no calibra las bombas. Esta información es importante si se desea identificar problemas en la dosificación de los pesticidas y ello se relaciona con la concentración de plaguicidas en los cultivos. Se observó que el 83,3% de los productores de gulupa llevan el registro de plaguicidas aplicados, mientras que en los cultivos de granadilla y maracuyá lo registran sólo el 53,3 y 26,7% de los productores, respectivamente. De este modo se evidencia que en este aspecto los productores de gulupa son más cuidadosos, pues siguen las recomendaciones de las empresas exportadoras que comercializan sus productos. El 66,7% de los productores de granadilla encuestados realiza aplicación de pesticidas desde el comienzo del cultivo, mientras que los productores de maracuyá y gulupa aplican plaguicidas dependiendo de los síntomas de enfermedades. Las dosis usadas por los agricultores son las recomendadas por las casas comerciales y que dependen de la plaga que quieren erradicar.

En la Figura 2 se muestra el resultado de la pregunta relacionada con el período de tiempo entre la última aplicación de plaguicidas y la recolección del producto. Se observa que, para los productores

**Tabla 3.** Porcentajes de recuperación, precisión intermedia, límites de detección y cuantificación.

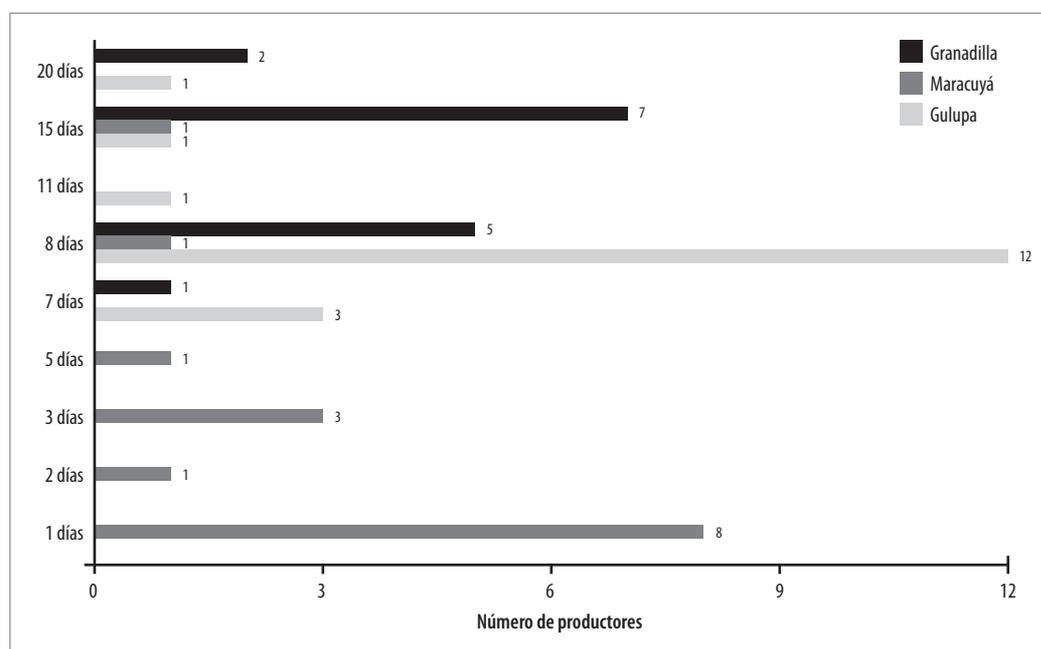
Plaguicida	%R N1 (% CV)	%R N2 (% CV)	%R N3 (% CV)	LOD µg/kg	LOQ µg/kg
Metamidofos	38,75 (18,86)	45,55 (13,09)	39,51 (12,83)	24,3	100,1
Monocrotofos	65,10 (17,85)	79,47 (14,42)	71,67 (5,93)	6,9	32,2
Carbofuran	79,68 (10,30)	93,02 (7,59)	83,53 (3,83)	7,5	20
Clorotalonil	71,97 (11,81)	91,61 (9,74)	80,74 (17,47)	2,2	8,9
Pirimetamil	81,31 (14,36)	93,48 (8,40)	85,85 (2,23)	0,7	2,6
m-Paration	79,00 (12,29)	93,66 (7,19)	88,63 (1,23)	1,2	4,5
Malation	92,91 (10,04)	110,44 (40,28)	89,96 (18,69)	20,0	20,0
Clorpirifos	91,16 (10,46)	99,01 (3,17)	90,77 (1,60)	1,7	6,0
Profenofos	83,33 (11,25)	94,97 (1,98)	88,25 (4,87)	5,8	20,0
Tebuconazol	100,22 (16,33)	92,56 (15,24)	75,69 (15,43)	7,9	20,1
Tetradifon	86,71 (48,62)	98,81 (5,25)	87,11 (3,56)	3,2	20,0
λ-Cihalotrina	74,76 (15,71)	103,03 (2,30)	89,25 (6,55)	18,1	20,1
Cipermetrina	95,46 (16,23)	95,97 (7,09)	87,64 (1,32)	57,5	100,0
Difenoconazol	88,20 (8,22)	84,79 (3,76)	88,57 (0,51)	8,8	50,1
Deltametrina	60,91 (15,41)	107,52 (7,28)	84,77 (10,70)	58,0	100
Azoxistrobin	75,56 (12,26)	90,77 (9,98)	88,83 (3,03)	2,3	9,2

N = 5 réplicas; LOD: Límite de Detección; LOQ: Límite de Cuantificación; %CV: Coeficiente de variación.

de maracuyá, el tiempo entre la última aplicación de los plaguicidas y la cosecha es muy corto si se compara con los productores de granadilla y gulupa quienes, en general, muestran períodos superiores a ocho días.

En la Tabla 4 se presentan los plaguicidas aplicados por los agricultores, el rango de *períodos de carencia* recomendados por las casas comerciales para diferentes tipos de cultivos (13), el límite máximo de

residuo (LMR) aceptado por la Comunidad Económica Europea en frutas de la pasión (14), clasificación toxicológica de diferentes presentaciones comerciales que contienen el principio activo y clasificación según plaga objetivo. Se encontró que la mayoría de plaguicidas que aplican los agricultores no se encuentran registrados ante el ICA para pasifloras. Solamente poseen registros λ-cihalotrina, deltametrina y tebuconazol en ciertos productos comerciales (15).

**Figura 2.** Período de tiempo entre la última aplicación de pesticidas y la recolección del producto.

**Tabla 4.** Plaguicidas usados por los agricultores de acuerdo a las encuestas.

Plaguicida	*Periodo de carencia (días)	LMR (mg/kg)**	Clasificación toxicológica	Modo de acción
Metamidofos	14-21	0,01	I	Insecticida
Monocrotofos	7-30	0,01	I	Insecticida
Carbofuran	14-90	0,01	I	Insecticida
Clorotalonil	3-15	0,01	II y III	Fungicida
Pirimetanil	3 -21	0,05	III	Fungicida
m-Paration	15-28	0,01	I	Insecticida
Malation	7 días	0,02	II y III	Insecticida
Clorpirifos	7-90	0,05	II y III	Insecticida
Profenofos	14-28	0,01	II	Insecticida
Tebuconazol	3-21	0,05	II y III	Fungicida
Tetradifon	Se aplica en flores	0,01	II y III	Acaricida
$\lambda$ -Cihalotrina	1-45	0,02	III y II	Insecticida
Cipermetrina	3-21	0,05	II y III	Insecticida
Difenoconazol	7-30	0,1	III y II	Fungicida
Deltametrina	3-35	0,05	II, III y IV	Insecticida
Azoxistrobin	1-35	4,0	II y III	Fungicida

\* Tiempos entre la última aplicación y la cosecha reportados para diferentes tipos de cultivo.

\*\* Límite máximo de residuo (LMR).

### Resultados de los análisis de laboratorio

En cada una de las muestras de pasifloras recolectadas se realizó un análisis de residuos de plaguicidas por duplicado. En las Tablas 5, 6 y 7 se presenta el plaguicida encontrado por finca y su concentración en mg/kg. La abreviatura ND significa que no hubo detección de señal bajo

la metodología realizada ni identificación de ninguno de sus iones. En la última columna se reporta el tiempo en días entre la última aplicación de plaguicidas y el día del muestreo, el cual coincidió con la recolección de la producción del cultivo.

Como se observa, los plaguicidas encontrados corresponden con los productos empleados en cultivos de pasifloras de acuerdo a las encuestas realizadas. Se observa además, coherencia entre los resultados

**Tabla 5.** Plaguicidas detectados en las fincas con cultivos de granadilla.

Productor	Plaguicida	M1 (mg/kg)	M2 (mg/kg)	Tiempo entre la última aplicación y el muestreo (días)
14	Clorotalonil	0,015	ND	11
	$\lambda$ -Cihalotrina	ND	0,022	
	Cipermetrina	ND	ND	
3	Clorotalonil	ND	0,012	11
	Pirimetanil	0,001	0,001	
2	Clorotalonil	ND	0,003	25
	Pirimetanil	0,017	0,009	
	$\lambda$ -Cihalotrina	0,091	0,073	
1		ND	ND	11
15	Clorotalonil	0,750	0,192	11
	$\lambda$ -Cihalotrina	ND	0,032	
10		ND	ND	14

M1: Muestra 1; M2: Muestra 2; ND: no detecta.

**Tabla 6.** Plaguicidas detectados en las fincas con cultivos de maracuyá.

Productor	Plaguicida	M1 (mg/kg)	M2 (mg/kg)	Tiempo entre la última aplicación y el muestreo (días)
48	Monocrotofos	0,020	ND	7
41	Monocrotofos	0,013	0,027	11
	Carbofuran	0,013	ND	
	Cipermetrina	0,087	0,123	
34	Carbofuran	0,008	ND	8
40	Monocrotofos	0,123	0,141	8
	Carbofuran	0,021	0,008	
	Cipermetrina	0,128	0,175	
47	Profenofos	ND	0,009	8
43	Profenofos	ND	0,019	4

M1: Muestra 1; M2: Muestra 2; ND: no detecta.

obtenidos entre muestras de una misma finca, pues a pesar de la variabilidad en el muestreo en campo, los resultados son muy similares.

Se observa principalmente la presencia de clorotalonil y  $\lambda$ -Cihalotrina en cultivos de granadilla. A pesar que la última aplicación de plaguicidas se realizó entre 11 y 25 días antes del muestreo, las concentraciones encontradas fueron excesivamente altas; es de resaltar que se recomiendan periodos de carencia para ciertos cultivos hasta de 45 días para  $\lambda$ -Cihalotrina y hasta 15 días para clorotalonil.

En los cultivos de maracuyá se encontraron altas concentraciones de monocrotofos y cipermetrina principalmente, mientras en cultivos de gulupa se reportaron las concentraciones más altas para deltametrina. Estos resultados indican que los plaguicidas aplicados difieren dependiendo del cultivo. Al observar los resultados de las muestras podemos decir que los plaguicidas más frecuentemente detectados fueron: monocrotofos (cinco muestras), azoxistrobin (cuatro muestras) y clorotalonil (cinco muestras) en muestras de maracuyá, gulupa y granadilla, respectivamente. En cinco fincas se encontraron concentraciones de plaguicidas que superaron los límites máximos de residuos.

#### Productores de granadilla

En la Tabla 5 se puede observar que en sólo dos fincas no se encontraron residuos de plaguicidas. En tres fincas se encontró dos plaguicidas en

común, clorotalonil y  $\lambda$ -Cihalotrina indicando prácticas agrícolas similares. En una de estas fincas las concentraciones encontradas fueron las más altas. Clorotalonil y  $\lambda$ -Cihalotrina superaron el límite máximo de residuos en dos fincas; por tanto, estos productos no cumplirían con los requisitos para exportación.

#### Productores de maracuyá

En la Tabla 6 se puede observar que en todas las fincas se encontraron residuos de plaguicidas. Es evidente que en el cultivo de maracuyá las prácticas agrícolas son diferentes a las implementadas por los productores de granadilla, pues se encontraron diferentes plaguicidas. En dos fincas se encontraron los mismos plaguicidas y, además, presentaron concentraciones excesivamente elevadas de monocrotofos y cipermetrina, lo cual indica que no se llevan adecuadamente las prácticas agrícolas. Estas dos fincas producen maracuyá y la producción no cumple con la reglamentación, pues las concentraciones sobrepasan los límites máximos de residuos. En cuatro fincas se encontraron residuos de los plaguicidas aplicados que no superaron los límites permitidos.

#### Productores de gulupa

En la Tabla 7 se observa que solamente una finca no presentó residuos de plaguicidas de los agroquímicos aplicados. En otra finca se encon-

**Tabla 7.** Plaguicidas detectados en las fincas con cultivos de gulupa.

Productor	Plaguicida	M1 (mg/kg)	M2 (mg/kg)	Tiempo entre la última aplicación y el muestreo (días)
16	Pirimetnil	0,002	ND	16
32	Clorotalonil	0,007	ND	16
	Difenoconazol	ND	0,029	
	Azoxistrobin	ND	0,008	
25	Tebuconazol	0,048	0,027	7
	$\lambda$ -Cihalotrina	0,017	ND	
	Deltametrina	0,074	0,071	
	Azoxistrobin	0,003	ND	
29		ND	ND	7
33	$\lambda$ -Cihalotrina	0,026	0,026	9
	Azoxistrobin	0,028	0,045	
28	Pirimetnil	0,021	0,017	52

M1: Muestra 1; M2: Muestra 2; ND: no detecta.

traron residuos de cuatro plaguicidas, dentro de los cuales se encuentra la deltametrina superando el límite máximo de residuos, el cual es 0,05 mg/kg. En las fincas estudiadas, cuatro fincas cumplirían con los límites máximos permitidos en sus productos.

De acuerdo con la regulación de la Comunidad Económica Europea respecto a límites máximos de residuos algunos de los productos de las fincas mencionadas anteriormente, cumplen con el requisito de inocuidad, pues no exceden la concentración de 0,010 mg/kg. Se ha establecido que, para matrices que no tengan estudios referentes a límites máximos de residuos –como es el caso de las frutas exóticas y en especial las ‘frutas de la pasión’, se toma por defecto el valor de 0,010 mg/kg como el máximo valor permitido, ya que se considera un nivel suficientemente bajo para proteger al consumidor de la ingesta de cantidades no autorizadas o excesivas de residuos de plaguicidas (14).

Retomando la información suministrada por los agricultores, es interesante observar que las concentraciones altas encontradas en algunas muestras mantienen cierta relación con los sistemas de fumigación; en efecto, cuando se preguntó a los agricultores sobre la revisión de las bombas y sistemas de aspersión, en ningún caso se encontró información sobre mantenimiento o calibración de estos equipos y por esta razón es probable que en las prácticas agrícolas haya aplicaciones erróneas de las cantidades recomendadas para los plaguicidas.

En el mundo se han reportado algunos estudios de residualidad de plaguicidas en pasifloras; por ejemplo en Brasil se encontraron residuos de m-paration excediendo 0,010 mg/kg (16). En Irlanda y Suecia se encontraron residuos de clorotalonil y dimetoato, en pasifloras importadas de Kenia, con concentraciones mayores a las permitidas por los organismos de control (17, 18). En Bélgica, en monitoreos realizados en pasifloras en 2008, se encontró difenoconazol por encima de los LMR (19). Un estudio de residuos de plaguicidas en frutas y vegetales provenientes de Sur América reportó concentraciones de cipermetrina y  $\lambda$ -Cihalotrina por encima de los límites máximos de residuos en frutas de la pasión (20).

Estudios sobre residualidad de plaguicidas en cultivos de maracuyá en Colombia, han mostrado la importancia del establecimiento de buenas prácticas agrícolas, pues se encontraron concentraciones superiores a los LMR de malation, mancozeb y etofenprox hasta después de ocho días de la aplicación (21). También se encontró que los plaguicidas aplicados dentro de los períodos de carencia recomendados se encuentran por debajo de los límites máximos de residuos (22).

Uno de los principales problemas que se presenta en Colombia es que no se han establecido límites máximos de residuos para la mayoría los plaguicidas que se aplican en frutas tropicales incluyendo las pasifloras; por tanto, el valor de LMR para estos productos se debe tomar por defecto y corresponde al valor de 0,010 mg/kg el cual es bastante bajo, restringiendo la exportación de estas frutas.

## Conclusiones

De acuerdo con los resultados, se demostró que los residuos de plaguicidas exceden los límites máximos de residuos (LMR) de la Unión Europea en las tres especies de pasifloras analizadas; los plaguicidas identificados en las muestras corresponden con los aplicados por los agricultores. Se estableció que la presencia de residuos se debe principalmente a la no implementación de buenas prácticas agrícolas por parte de los agricultores, fundamentalmente a la relacionada con el tipo de plaguicida que se aplica, pues la mayoría de los plaguicidas que los agricultores usan no se encuentran registrados para su uso en ‘frutas de la pasión’.

Los resultados señalan la necesidad de un seguimiento frecuente, mediante análisis de residuos de plaguicidas, a fin de asegurar la calidad e inocuidad de las frutas tropicales, tanto para exportación, como para consumo nacional. Los resultados destacan la urgencia de desarrollo

e implementación de paquetes integrados de control de plagas en los cultivos de pasifloras y de sensibilización sobre el buen uso de plaguicidas.

## Referencias

- Hernández, A.; Bernal R. Lista de especies de *Passifloraceae* de Colombia. *Biota Colombiana*. 2000. 1(3): 320-335.
- MADR - Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Anuario Estadístico de frutas y hortalizas 2004-2008 y sus calendarios de siembras y cosechas. Bogotá D.C.: Dirección de Política Sectorial. 2009.
- Benítez H., Solange V. Caracterización del agente etiológico de la enfermedad denominada “Mancha de aceite” en cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* SIMS) en zonas productoras de Colombia. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 2010.
- Miranda, D.; Fischer, G.; Carranza, C.; Magnitskiy, S.; Casierra, F.; Piedrahita, W.; Florez, L. Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas (SCCH), Bogotá, Colombia. 2009. 345 p. Disponible en: [http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca\\_118\\_cultivo\\_poscosechavp.pdf](http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_118_cultivo_poscosechavp.pdf). [Consultado en febrero de 2013].
- Legiscomex.com. Inteligencia de mercados: exportación de frutas exóticas colombianas. 2013. 20 p. Disponible en: <http://www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/exportaciones-estudio-frutas-exoticas.pdf>. [Consultado en enero de 2013].
- Wyckhuys, K.; López, F.; Rojas, M.; Ocampo, J. The relationship of farm surroundings and local infestation pressure to pest management in cultivated *Passiflora* species in Colombia. *International Journal of Pest Management*. 2011. 57(1): 1-10.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Elaboración de un marco para las buenas prácticas agrícolas. Publicación COAG/2003/6. Roma: Comité de Agricultura -FAO. 2003.
- MADR - Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Plan Nacional para la Implementación de BPA. Dirección de Desarrollo Tecnológico y Protección Sanitaria. 2006.
- GLOBALGAP. The Global Partnership for Safe and Sustainable Agriculture. <http://www.globalgap.org>
- Aysal, P.; Ambrus, A.; Lehotay, S.; Cannavan, A. Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. *J Environ Sci Health B*. 2007. 42(5): 481-490.
- SANCO. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed. Document No. SANCO/12495. 2011.
- Ahumada, D.; Guerrero, D. J. Estudio del efecto matriz en el análisis de plaguicidas por cromatografía de gases. 2010. *Vitae*. 17(1): 51-58.
- De Liñan, C. *Vademecum de productos fitosatinarios y nutricionales*. México D.F.: Ediciones B Agrotécnicas, SL. 2007.
- The European Parliament and the Council of the European Union. On maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin. EC-No.-396/2005. 2005.
- ICA - Instituto Colombiano Agropecuario. Registro de plaguicidas. <http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Regulacion-y-Control-de-Plaguicidas-Quimicos.aspx>. [Consultado en febrero de 2013].
- Rodrigues, D.; Carvalho, T.; Sousa, A.; Sousa, V.; Fechine, P.; Nascimento. Determination of Insecticide Residues in Vegetal Fruits. *Chromatography Res Internat*. 2011. 2: 1-6.

17. Ireland-Government. Pesticides Residues in Food. Dublin, Ireland: Department of Agriculture & Food, pesticide control service. 2003.
18. Andersson, A.; Jansson, A.; Eskhult, G. A. The Swedish Monitoring of Pesticide Residues in Food of Plant Origin. Uppsala, Sweden: National Food Administration. 2003.
19. Claeys, W.; Schmit, J.; Bragard, C.; Maghuin, R.; Pussemier, L.; Schiffers, B. Exposure of several Belgian consumer groups to pesticide residues through fresh fruit and vegetable consumption. *Food Control*. 2011. **22**(3-4): p. 508-516.
20. Hjorth, K.; Johansen, K.; Holen, B.; Andersson, A.; Christensen, H. B.; Siivinen, K.; Toome, M. Pesticide residues in fruits and vegetables from South America – a Nordic project. *Food Control*. **22**: 1701–1706.
21. Romero A. C.; Gonzáles A. Análisis de residualidad de plaguicidas en cultivos de maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 2010.
22. Juraske, R.; Fantke, P.; Romero, A.; González, A. Pesticide residue dynamics in passion fruits: Comparing field trial and modelling results. *Chemosphere*. 2010. **89**: 850–855.

**Article citation:**

Bastidas, D. A.; Guerrero, J. A.; Wyckhuys, K. Residuos de plaguicidas en cultivos de pasifloras en regiones de alta producción en Colombia. *Rev Colomb Quim*. 2013. **42**(2): 39-47.

## Autoensamblaje de un cuadrado supramolecular a partir del complejo $[\text{Ni}(\text{dppe})(\text{TOF})_2]$ con 4,4'-bipiridina

### Resumen

El interés principal de esta investigación es contribuir al desarrollo y comprensión de la química supramolecular y de las arquitecturas moleculares construidas mediante el autoensamblaje de entidades complementarias. A tal fin se sintetizó y caracterizó (UV, FT-IR, Raman, análisis elemental, RMN <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P, <sup>19</sup>F, COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) un cuadrado supramolecular de níquel (II) [7]. Este proceso se realizó a partir de la síntesis del complejo inicial:  $[\text{Ni}(\text{dppe})\text{Cl}_2]$  [3], el cual fue sintetizado entre el cloruro de níquel [1] y difenilfosfino etano (dppe) [2]. Luego se realizó la síntesis del complejo de interés,  $[\text{Ni}(\text{dppe})(\text{TOF})_2]$  [5], entre el complejo [3] y el trifluorometanosulfonato de plata (Ag-TOF) [4]. Finalmente el proceso de autoensamblaje se realizó entre el complejo [5] y el ligando orgánico 4,4'-bipiridina [6], los cuales actúan como vértice y arista respectivamente, en la estructura del cuadrado.

De acuerdo con los diferentes análisis realizados, se encontró que el autoensamblaje generó una única especie supramolecular, siendo la especie cuadrada la estructura termodinámica más probable.

**Palabras clave:** compuesto de coordinación de níquel(II), dppe, 4,4'-bipiridina, autoensamblaje, cuadrado supramolecular.

## Self-assembly of a supramolecular square between $[\text{Ni}(\text{dppe})(\text{TOF})_2]$ and 4,4'-bipyridine

### Abstract

The main interest of this research is to contribute to the development and understanding of supramolecular chemistry and molecular architectures, which are constructed by the self-assembly of supramolecular entities. Therefore, the synthesis and characterization (IR, UV, <sup>1</sup>H NMR, <sup>31</sup>P, <sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY) of a nickel (II) supramolecular square [7] was performed through the synthesis between nickel chloride [1] and diphenylphosphinoethane (dppe) [2] to form the precursor complex  $[\text{Ni}(\text{dppe})\text{Cl}_2]$  [3]. This was followed by the synthesis of the complex of interest,  $[\text{Ni}(\text{dppe})(\text{TOF})_2]$  [5], using the precursor and silver trifluoromethanesulfonate (Ag-TOF). Finally, the self-assembly was performed between the complex [5] and the organic ligand 4,4'-bipyridine [6], which act as vertex and edge, respectively.

According to various analyses, it was found that the self-assembly generated only one supramolecular species; a square is the most probable thermodynamic structure.

**Keywords:** Nickel(II) coordination complex, dppe, 4,4'-bipyridine, self-assembly, supramolecular square.

## Automontagem de um quadrado supramolecular a partir do complexo $[\text{Ni}(\text{dppe})(\text{TOF})_2]$ com 4,4'-bipiridina

### Resumo

O interesse principal de esta investigação foi contribuir ao desenvolvimento e entendimento da química supra-molecular e as arquiteturas moleculares, construídas mediante a automontagem de entidades complementarias. Assim, se realizou, a sínteses e caracterização (UV, FT-IR, Raman, análises elemental, RMN <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P, <sup>19</sup>F, COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) de um quadrado supra-molecular de níquel (II) [7]. Este processo se realizou, a partir da sínteses do complexo inicial:  $[\text{Ni}(\text{dppe})\text{Cl}_2]$  [3], o qual foi sintetizado entre o cloreto de níquel [1] e difenilfosfino etano (dppe) [2]. De seguida, foi realizada a sínteses do complexo de interesse:  $[\text{Ni}(\text{dppe})(\text{TOF})_2]$  [5], entre o complexo [3] e o trifluorometanosulfonato de prata (Ag-TOF) [4]. Finalmente, o processo de automontagem, foi realizado entre o complexo [5] e o ligando orgânico 4,4'-bipiridina [6], os quais atuam como vértice y arista na estrutura do quadrado, respectivamente.

De acordo aos diferentes análises realizados, se encontrou que a automontagem originou uma única espécie supra-molecular, sendo a espécie quadrada, a estrutura termodinâmica mais provável.

**Palavras-chave:** composto de coordenação de níquel (II), dppe, 4,4'-bipiridina, automontagem, quadrado supramolecular.

## Introducción

LOS POLÍGONOS Y POLIEDROS metal-orgánicos MOP (*Metal Organic Polyhedra*) son compuestos generados entre ligandos orgánicos di y trí-tópicos con metales (generalmente de transición) que poseen dos o más sitios de coordinación disponibles. Estos arreglos moleculares nanométricos se pueden obtener mediante el autoensamblaje de subunidades, las cuales deben tener una geometría predefinida y complementaria, teniendo en cuenta variables como los ángulos de enlace, la disposición espacial y los puntos de enlace. Con el fin de controlar la forma y el tamaño de las mismas, estos arreglos supramoleculares se pueden subdividir en dos grupos: polígonos (MOP-2D) y poliedros (MOP-3D) (1). La importancia de esta familia de compuestos radica en las diversas y novedosas aplicaciones, tales como nanoreactores, nanosensores moleculares, química de inclusión, síntesis de nano partículas, nanocatálisis, reconocimiento molecular y nanoelectrónica, entre otras (2-7).

Un ejemplo de esto fue presentado por Würthner al funcionalizar las cavidades de un cuadrado con unidades derivadas del Perileno, lo cual le ofrece propiedades electroquímicas y de fluorescencia; las interacciones que se presentan en estos cuadrados pueden cambiar fuertemente las propiedades de fluorescencia y de absorción de luz. Según el radical que tengan enlazado, y de acuerdo con su concentración en solución, se presentan cambios en la intensidad de onda de absorción y emisión de luz, lo que permite identificar la molécula huésped, al igual que su concentración (8).

Por otra parte, la construcción de dichos polígonos supramoleculares se basa principalmente en el enfoque nanotecnológico de

construcción “abajo hacia arriba” (*bottom-up*), el cual hace uso de las propiedades químicas de las moléculas para realizar procesos de reconocimiento y asociación espontánea a escala nano. Uno de los primeros polígonos supramoleculares autoensamblados utilizando este enfoque de construcción, fue el cuadrado supramolecular reportado en el año 1983 por Stricklen *et al.* (9), el cual fue construido entre subunidades del ligando orgánico lineal  $P(OCH_2)_3P$  y los complejos angulares cis-[Cr(CO)<sub>4</sub>(norbornadieno)] ó cis-[W(CO)<sub>4</sub>(norbornadieno)]. Posteriormente, Fujita sintetizó en 1990 cuadrados supramoleculares, empleando compuestos de Pd(II) con alquildiaminas y arildiaminas (10). Luego, en 1994, Stang obtuvo cuadrados basándose en complejos de Pd(II) y Pt(II) con alquildifosfinas (11). Tanto Fujita como Stang emplearon el ligando orgánico lineal 4,4'-bipiridina, cuyos átomos coordinantes se sitúan a 180°, el cual actúa como arista en la estructura del polígono.

Estas estructuras han despertado el interés científico, debido a las propiedades y aplicaciones químicas novedosas encontradas. Se han construido estructuras más complejas como prismas, cubos, cubo-octaedros, octaedros, esferas, etc. (12-17).

Para la síntesis de estos arreglos supramoleculares, los metales de transición más utilizados han sido el paladio(II) y el platino(II). A la fecha, únicamente se han encontrado reportes de dos cuadrados supramoleculares por Ekkenhardt (17) y Byabartta (18) y de dos cubos (19, 20), sintetizados a partir de complejos de níquel(II) y utilizando diferentes ligandos como conectores. Dado su bajo costo, y con el fin de comprender mejor la química de coordinación del níquel en estos arreglos supramoleculares, se reporta a continuación el estudio realizado al cuadrado [7] autoensamblado entre el complejo precursor de níquel(II) [5] con 4,4'-bipiridina (Figura 1).

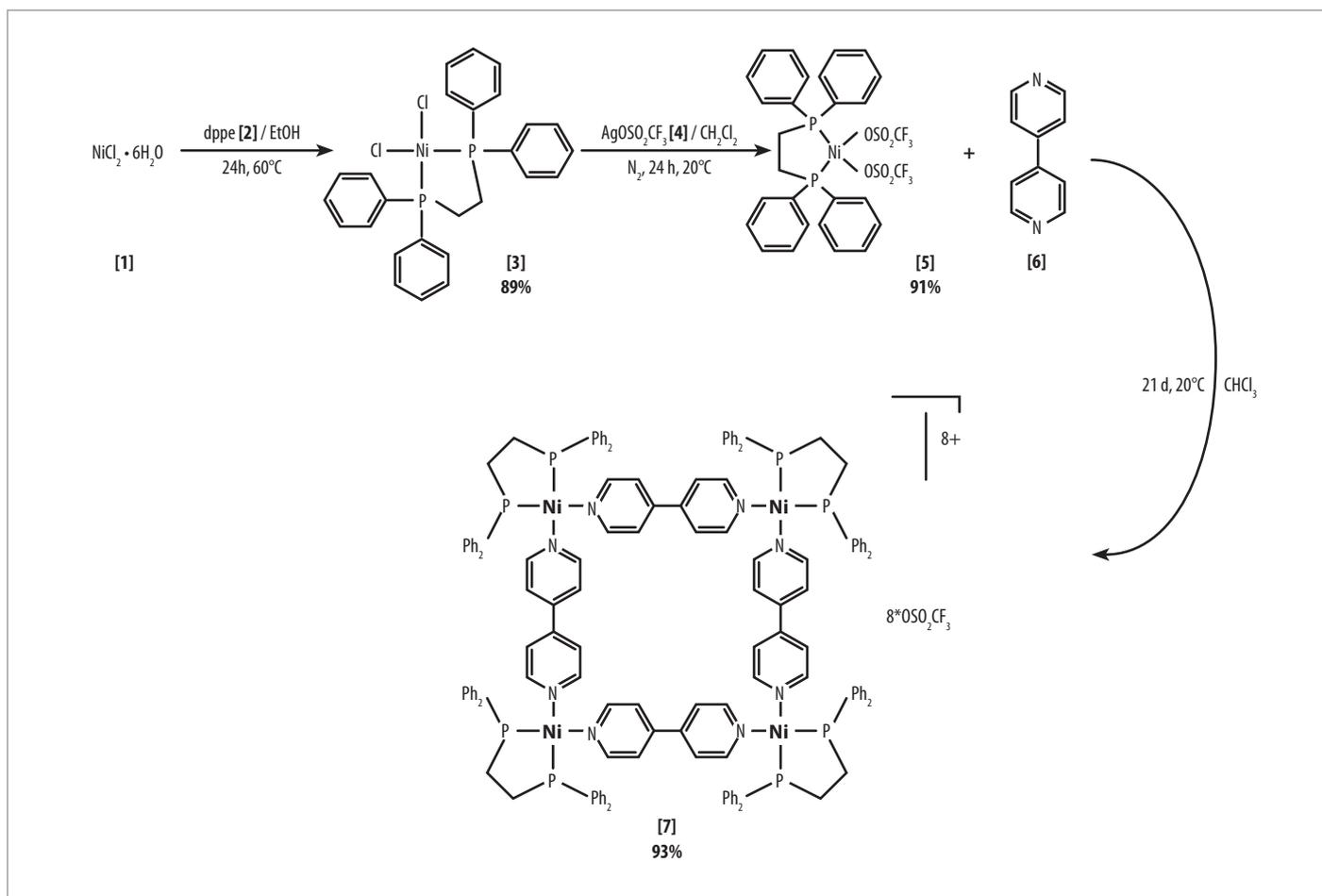


Figura 1. Pasos de síntesis en el proceso de autoensamblaje supramolecular de níquel [7].

## Materiales y métodos

### Equipos y reactivos

La síntesis de todos los complejos se realizó utilizando reactivos grado técnico, los cuales fueron previamente destilados en el rotavapor. Los espectros de RMN fueron tomados utilizando reactivos deuterados, grado analítico. Las destilaciones a presión reducida se llevaron a cabo en el equipo Heidolph Laborota® 4001. Espectros FT-IR: espectrofotómetro Shimadzu FT-IR Solutions® (4000-400 cm<sup>-1</sup>, KBr). Espectros Raman: Raman Spectroscope Thermo Scientific® DXR (780 nm). Espectros UV-Vis: espectrofotómetro Ultraviolet Spectrum Perkin-Elmer Lambda Series/PECSS200® (200-700 nm, CHCl<sub>3</sub>). AE: Thermo Eager 30 (-2,58 mV - 76,86 mV). Espectros RMN: equipo Bruker Avance® 400 Ultrashield, RMN <sup>1</sup>H y COSY (400 MHz, acetona-d<sub>6</sub>, TMS). RMN <sup>31</sup>P (162 MHz, acetona-d<sub>6</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 %). RMN <sup>19</sup>F (282 MHz, acetona-d<sub>6</sub>, FC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

La síntesis del complejo [1,2-bis(difenilfosfino)etano]dicloroníquel (II) [Ni(dppe)Cl<sub>2</sub>] [3], se realizó según lo reportado por Van Hecke (21). En un balón de 100 mL de una sola boca se colocó (1 mmol; 0,238 g NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O [1]) en 30 mL de etanol (98%) a temperatura ambiente. Con ayuda de una pipeta Pasteur, se adicionó lentamente la solución de (1 mmol; 0,398 g dppe [2]) en 15 mL de etanol (98%) caliente. Esta mezcla, que inicialmente fue roja, se fue tornando naranja debido al progreso de la reacción. La mezcla se agitó por una hora y finalmente se filtró al vacío el sólido naranja resultante empleando un embudo Buchner. Al sólido obtenido se le realizaron lavados sucesivos con porciones de 5 mL etanol y 10 mL de éter etílico, para posteriormente llevarlo a alto vacío y secarlo por cuatro horas. El rendimiento de la reacción fue del 89%.

**UV-Vis** ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ : nm): 238,0 (TC L-M), 281,00 ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ), 450,00 ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ). **FT-IR** ( $\bar{\nu}_{\text{max}}^{\text{pastilla en KBr}}$ : cm<sup>-1</sup>): 3053,39 (CH), 2921,71 (C-H), 2850,89 (C-H), 1654,59 (C-C), 1584,22 (CC), 1480,82 (C-H), 1435,04 (PC), 1400,28 (P-CH<sub>2</sub>), 1319,84 (CH<sub>2</sub>), 1304,03 (CH<sub>2</sub>), 1182,55 (C-H), 1097,60 (PC), 1027,67 (C-H), 998,21 (Ar), 876,25 (C-H), 817,49 (C-H), 755,71 (C-H), 686,53 (PC), 654,59 (Ar). **Análisis elemental**: Calculado: H: 4,55% y C: 59,20%. Experimental: H: 4,5% y C: 59,3%. **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ : ppm): 2,13 (d, 4H, J=17,43 Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 8,08 - 7,44 (m, 20H, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) (8,00 (s, 8H, H<sub>orto</sub>), 7,35 (m, 4H, H<sub>para</sub>), 7,58 (t, 8H, H<sub>meta</sub>). **RMN <sup>31</sup>P** (CDCl<sub>3</sub>, 162 MHz, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%,  $\delta$ : ppm): 57,16 (s, P-dppe).

La síntesis del complejo [1,2-bis(difenilfosfino)etano]bis(trifluorometanosulfonato) níquel(II) [Ni(CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(dppe)] [5], se realizó según lo reportado por Fochi (22). En un balón de 100 mL de una sola boca, se colocó una disolución de (0,2 mmol; 0,106 g [Ni(dppe)Cl<sub>2</sub>]) [3] en 50 mL de diclorometano. Por otro lado, se pesaron (0,4 mmol, 0,103 g) de trifluorometanosulfonato de plata(I) (AgTOF) [4], el cual se adicionó rápidamente a la disolución anterior; esta mezcla se dejó reaccionar por 3 horas a temperatura ambiente con agitación permanente, para ser filtrada y lavada con tres porciones de éter etílico cada una de 8 mL, dejándose secar por tres horas en alto vacío. Posteriormente fue necesario separar el compuesto [5] (el cual se encontraba mezclado con el AgCl producido en la reacción), empleando un sistema de extracción tipo Soxhlet, utilizando como solvente de extracción diclorometano (23). La reacción presentó un rendimiento de 91% (24).

**UV-Vis** ( $\bar{\nu}_{\text{max}}^{\text{pastilla en KBr}}$ : cm<sup>-1</sup>): 244,00 (TC L-M), 265,00 (TC L-M), 335,00 ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ). **FT-IR** ( $\bar{\nu}_{\text{max}}^{\text{pastilla en KBr}}$  y  $\bar{\nu}_{\text{max}}$ : cm<sup>-1</sup>, KBr): 3454,47 (CH), 1481,14 (C-H), 2918,38 (CH<sub>2</sub>), 1584,73 (CH<sub>2</sub>), 1436,47 (P-C), 654,63 (P-C), 1099,56 (P-C), 1258,06 (SO), 1224,27 (C-F), 1224,27 (C-F), 1150,48 (C-F), 1277,10 (SO), 1028,91 (SO), y 63,31 (C-F), 810,54 (C-F), 748,69 (C-F). **Raman** (cm<sup>-1</sup>): 3061,97 (v CH ar.), 1584,87 (v C=Car.), 1097,66 (v dppe resp.), 1031,21 (v CH Def. dppe.), 1002,84 (v CH Def. dppe), 755,82 (v. C-F), 675,91 (v Def. ar.), 617,67 (v Def. ar.), 521,20 (v Def. monosust.), 425,86 (v Ni-O), 270,43 (v Ni-Ph), 221,08 (v Ph-P-Ph Def.), 164,27 (v. red). **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ : ppm):

7,99 - 7,57 (m, 20H, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7,99 (dd, 8H, H<sub>orto</sub>), 7,57 (d, 8H, H<sub>meta</sub>), 7,71 (d, 4H, H<sub>para</sub>), 2,16 (d, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=17,76 Hz). **RMN <sup>31</sup>P** (CDCl<sub>3</sub>, 162 MHz, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%,  $\delta$ : ppm): 57,25 (s, P-dppe). **RMN <sup>19</sup>F** (282 MHz, acetona-d<sub>6</sub>, F-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>,  $\delta$ : ppm): -78,2 (s, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>).

### Autoensamblaje del cuadrado supramolecular de níquel [7]

El compuesto Tetraquis[1,2-bis(difenilfosfino)etano(4,4'-bipiridina) (bistriflato)níquel (II)] [7] (ver Figura 1), se obtuvo siguiendo la metodología reportada por Cano y Torres (23, 24). A 0,198 mmol (150 mg) del complejo [1,2-bis(difenilfosfino)etano] bis(trifluorometanosulfonato) níquel(II) [5] disueltos en 100 mL de CHCl<sub>3</sub>, se adicionaron 0,198 mmol (31 mg) de 4,4'-bipiridina [6] disueltos en 50 mL de CHCl<sub>3</sub>. La reacción se realizó en un balón de tres bocas, bajo atmósfera de nitrógeno con agitación magnética permanente y a temperatura ambiente por 3 semanas. La solución resultante se concentró hasta 5 mL en el rotavapor a 35 °C y 350 mbar, obteniéndose un precipitado fino de color verde oscuro, el cual fue separado por filtración y lavado con tres porciones de éter etílico cada una de 10 mL; finalmente fue secado en alto vacío por 4h. Se obtuvo un rendimiento del 93%.

**UV-Vis** ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ : nm): 244,00 (TC L-M), 265,00 (TC L-M), 310,00 ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) y 338,00 ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ). **FT-IR** ( $\bar{\nu}_{\text{max}}^{\text{pastilla en KBr}}$ : cm<sup>-1</sup>): 3058,98 (CH), 1835,03 (CC), 2924,99 (CH<sub>2</sub>), 2850,99 (CH<sub>2</sub>), 1606,17 (CN), 1437,02 (CN), 810,82 (CN), 1258,33 (SO), 1150,08 (SO), 1100,12 (CF), 1029,20 (CF), 636,38 (SO). **Raman** (cm<sup>-1</sup>): 1618,67 (v C-C bipiridina), 1303,05 (v C-C), (v C-N) y (v C H), 321,07 (v Ni-N), enlace 207,74 (v P-Ph-P) y 272,33 (v Pd-Ph). **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, acetona d<sub>6</sub>,  $\delta$ : ppm): 8,60 (d, J=6,03Hz, 16 H), 7,10 - 7,76 (m, 96 H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 3,99 (d, J=4,80Hz, 16H). **RMN <sup>31</sup>P** (acetona d<sub>6</sub>, 162 MHz, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%,  $\delta$ : ppm): 30,334 (s, P-dppe). **RMN <sup>19</sup>F** (282 MHz, acetona-d<sub>6</sub>, FC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>,  $\delta$ : ppm): -78,88 (s, -CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>).

## Resultados y discusión

### Espectroscopia UV-Vis

En el espectro UV-Vis tomado al compuesto [7] (Figura 2) se presentan las bandas ubicadas en 244 nm y 265 nm, las cuales corresponden a procesos de transferencia de carga ligando-metal (TC L-M), que se presentan por la transferencia de electrones  $\pi$  desde los enlaces con ligandos tipo fosfino hacia los orbitales *d* vacíos del metal (12). Mientras las bandas ubicadas en 310 nm y 338 nm, corresponden a transiciones electrónicas de tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  generadas por la excitación de los electrones  $\pi$  en los dobles enlaces de los carbonos aromáticos del dppe; además, a las transiciones de los electrones  $\pi$  en los dobles enlaces de los carbonos y nitrógenos aromáticos presentes en la estructura de la 4,4'-bipiridina, coordinada a los centros metálicos (25).

Estas asignaciones, son propuestas con base en los espectros tomados a cada uno de los componentes en su estado libre y a los complejos precursores. Teniendo en cuenta que la disolución del cuadrado [7] presenta una tonalidad amarilla, es de esperar que presente bandas de absorción cerca de la región UV (350 nm aprox.) (23, 24).

### Espectroscopia FT-IR

El estudio del cuadrado supramolecular [7] por espectroscopia FT-IR, muestra bandas ubicadas en 3058,98 cm<sup>-1</sup> y 1835,03 cm<sup>-1</sup>, las cuales corresponden a vibraciones de los carbonos e hidrógenos aromáticos de tipo (-CH), (=CH) de la 4,4'-bipiridina y de los grupos fenilo del

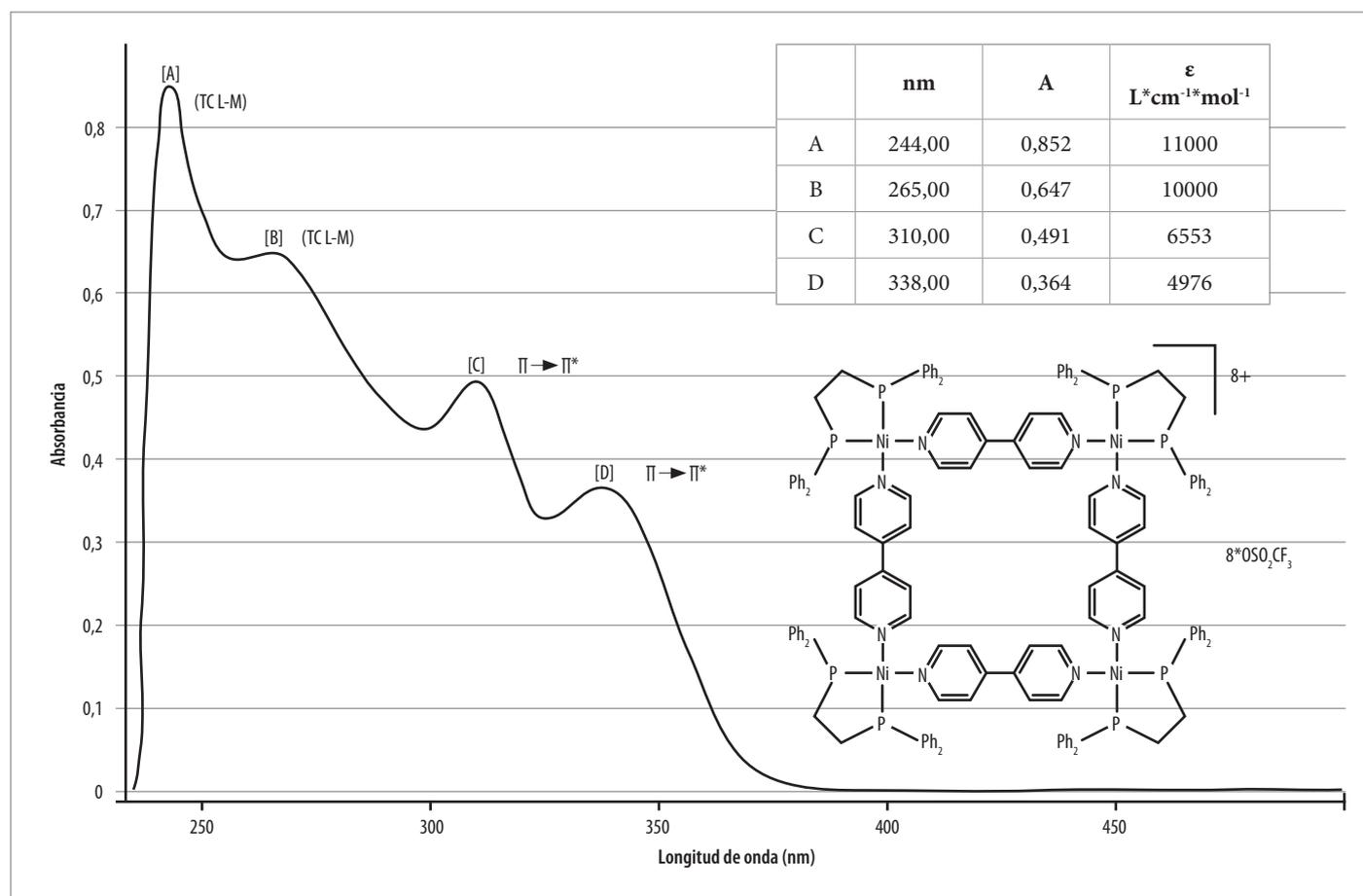


Figura 2. Espectro UV-Vis del cuadrado supramolecular [7], tomado en  $CHCl_3$ , con la asignación de la longitud de onda máxima de absorción ( $\lambda_{M\acute{a}x}$ ).

dppe, respectivamente; éstos se encuentran coordinados a los centros metálicos de Ni(II). Las bandas ubicadas en  $2924,99\text{ cm}^{-1}$  y  $2850,99\text{ cm}^{-1}$ , corresponden a las vibraciones de los carbonos e hidrógenos alifáticos ( $-CH_2-$ ) del grupo etilo que unen los átomos de fósforo en la estructura del dppe (22, 25).

Las bandas ubicadas en  $1606,17\text{ cm}^{-1}$ ,  $1437,02\text{ cm}^{-1}$  y  $810,82\text{ cm}^{-1}$ , corresponden a los modos vibracionales generados entre los carbonos y nitrógenos de la 4,4'-bipiridina coordinada a los centros metálicos de Ni(II). Las señales ubicadas en  $1258,33\text{ cm}^{-1}$ ,  $1150,08\text{ cm}^{-1}$ , y  $636,38\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones (S-O), mientras las bandas ubicadas en  $1100,12\text{ cm}^{-1}$  y  $1029,20\text{ cm}^{-1}$ , corresponden a las vibraciones (C-F) de los contra-iones triflato ( $CF_3SO_3^-$ ) (26).

### Espectroscopia Raman

El análisis por espectroscopia Raman se realizó como una técnica complementaria al estudio FT-IR; constituyéndose además, en el primer estudio realizado a un cuadrado supramolecular auto-ensamblado a partir del complejo de níquel [5] con 4,4'-bipiridina [6]. En este análisis se presentan las bandas características más relevantes generadas durante la coordinación de la 4,4'-bipiridina a los centros metálicos de níquel(II). La banda ubicada en  $1618,67\text{ cm}^{-1}$  corresponde a los modos vibracionales del enlace (C-C) en la 4,4'-bipiridina; las señales en  $1303,05\text{ cm}^{-1}$  son generadas por las enlaces (C-N) y (C-H) de la 4,4'-bipiridina; la banda correspondiente al enlace (Ni-N) se encuentra ubicada en  $321,07\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente, las bandas correspondientes a los modos vibracionales del enlace P-Ph y Ni-Ph están ubicadas en  $207,74\text{ cm}^{-1}$  y  $272,33\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente (24). Otras bandas relevantes en el espectro se encuentran

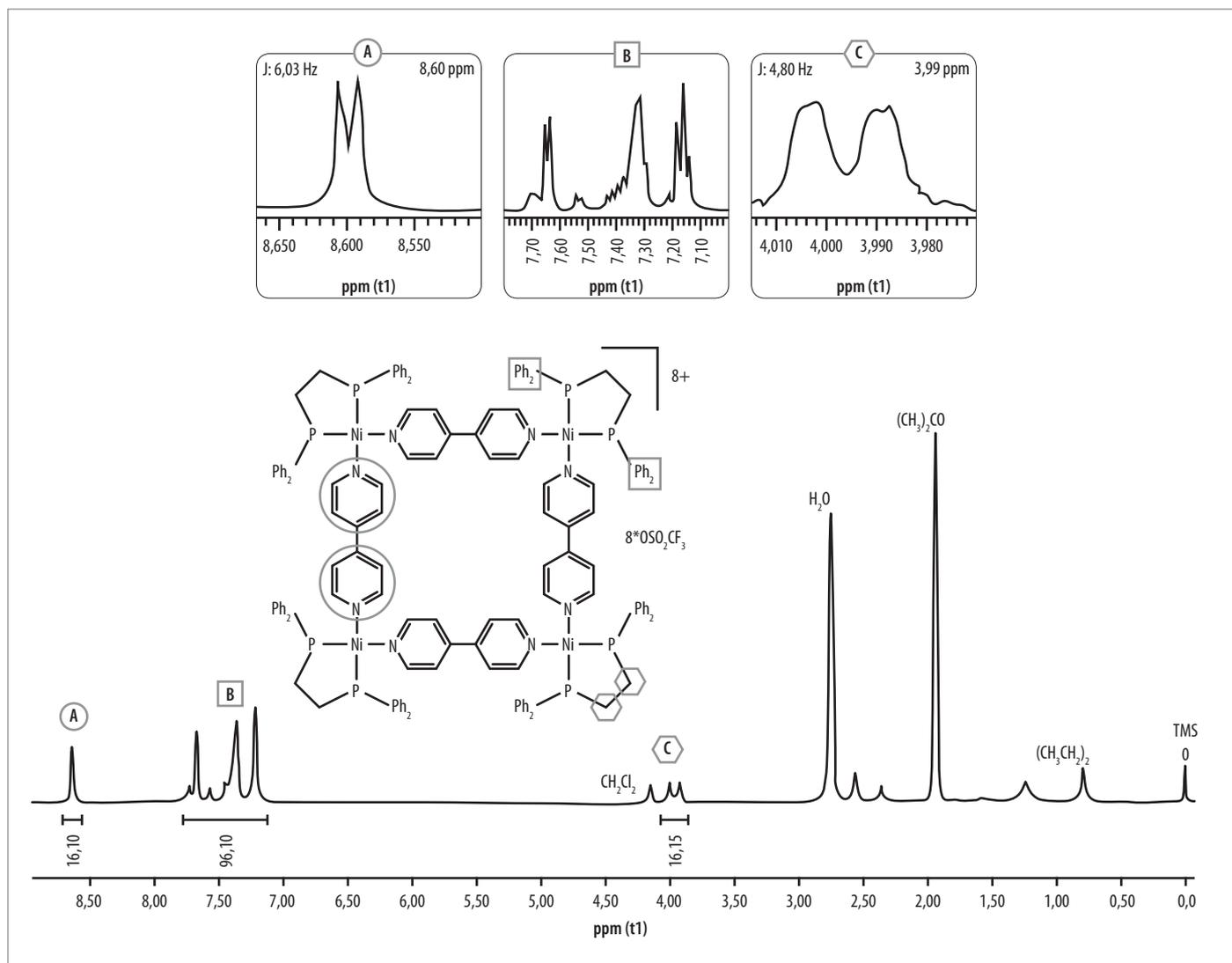
en:  $164,27\text{ cm}^{-1}$ ,  $1584,87\text{ cm}^{-1}$  y  $1002,84\text{ cm}^{-1}$ . Corresponden a los modos vibracionales de la red, de los enlaces C=C de los grupos fenilo y de los enlaces C-H del dppe, respectivamente. Estas bandas son similares a las reportadas en el estudio Raman realizado por Milton Franklin *et al.* (27) para el complejo [3].

### Espectroscopia RMN <sup>1</sup>H

Debido a la simetría del cuadrado supramolecular [7] (ver Figura 1), éste presenta señales representativas para cada uno de los tres tipos de protones en el macrociclo. Los protones alifáticos del dppe -coordinados a los átomos de Ni(II) formando las esquinas del cuadrado-, generan una señal [C] (3,99 ppm) que se puede describir como un doblete debido a la disposición espacial del grupo etilén ( $-CH_2-CH_2-$ ), que se presenta por efectos de su dinámica y anisotropía en este fragmento de la estructura; ello ocasiona que los hidrógenos allí ubicados se presenten con entornos diferentes entre sí (13, 22) (Figura 3).

En cuanto a los hidrógenos aromáticos del ligando dppe [2], se identifican un conjunto de señales ([B]: 7,10 ppm - 7,76 ppm, 96 H), correspondiente a los protones aromáticos del dppe (80 H) y a los protones  $\beta$  de la 4,4'-bipiridina (16 H). Estos valores difieren de los valores reportados para la 4,4'-bipiridina libre (7,76 ppm H $\alpha$  y 8,73 ppm H $\beta$ , acetona  $d_6$ ) (13).

Los protones  $\alpha$  de la 4,4'-bipiridina [6] que forman las aristas del cuadrado [7], generan una señal para este tipo de hidrógeno ([A]  $\alpha$ : 8,60 ppm); esto se debe a que, al coordinar el ligando [6] por el átomo de nitrógeno, ocurre una redistribución electrónica sobre esta molécula, haciendo que los hidrógenos  $\alpha$  de la 4,4'-bipiridina sufran



**Figura 3.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  correspondiente al cuadrado supramolecular  $[\text{Ni}(4,4'\text{-Bipiril})(\text{dppe})(\text{CF}_3\text{SO}_2)_4]$  [7] (acetona- $d_6$ , 400 MHz).

un efecto de desprotección electrónica mayor al presentado por los hidrógenos  $\beta$ , además por encontrarse más próximos al enlace metal-nitrógeno.

Al comparar el desplazamiento químico de los protones alifáticos del complejo precursor [5] (2,14 ppm) respecto al desplazamiento químico de estos mismos protones en [7] (3,99 ppm), se observa para la especie supramolecular un efecto de desprotección electrónica mayor. Así, los desplazamientos químicos de los protones aromáticos en la especie [7] sufren un efecto de desprotección electrónica menor con relación a los desplazamientos del complejo precursor [5] (22,25).

De igual manera, al contrastar los desplazamientos químicos reportados por Posada (13) para el autoensamblaje de las especies supramoleculares de Pd(II) con los reportados para el autoensamblaje de níquel(II) [7]; para este último se observa como los hidrógenos aromáticos, tanto del dppe [2] como de la 4,4'-bipiridina [6], presentan un efecto de desprotección electrónica menor. Para el proceso de autoensamblaje del cuadrado de níquel(II), los protones alifáticos presentan un efecto de desprotección electrónica mayor para el fragmento alifático del dppe (3,99 ppm), con relación a los valores de los protones en las especies de Pd(II) (3,39 ppm) (22).

En el paladio, los orbitales de valencia 4d son espacialmente más grandes que en níquel 3d; por lo tanto, se cree que al aumentar el tamaño de estos orbitales la retrodonación electrónica es menor, promovien-

do desplazamientos químicos ( $\delta$ : ppm) en algunos casos hacia campo alto y en otro hacia campo bajo, lo que se puede evidenciar en metales de menor tamaño como el níquel (II).

### Correlación homonuclear COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$

El espectro COSY:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , se realizó con el fin de verificar el acoplamiento entre las diferentes señales, generadas por los protones presentes en la estructura [7]. En el espectro (Figura 4a), se observan las correlaciones correspondientes al acoplamiento entre las señales ubicadas en ( $\alpha$ : 8,60 ppm y  $\beta$ : 7,76 ppm) (Figura 4b), acoplamiento que se da entre los protones  $\alpha$  y  $\beta$  de la 4,4'-bipiridina [6] coordinada al níquel (Figura 4).

La señal ubicada en  $\delta$ : 7,50 acopla con las señales en  $\delta$ : 7,20 y en  $\delta$ : 7,70 (Figura 4c), correspondiente a los protones ubicados en los grupos fenilo del fragmento difenilfosfina, presentes en la estructura del macrociclo [7].

Según lo reportado por Posada (13) en el año 2011, la síntesis de dos especies supramoleculares en equilibrio (triángulo-cuadrado), utilizando como bloque de construcción complejos de paladio(II) (13); y gracias al espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figura 4). Es posible descartar la coexistencia de otra especie supramolecular en solución, las cuales pueden presentarse en equilibrio; puesto que en el análisis sólo se observó el acoplamiento de

los hidrógenos  $\alpha$  de la 4,4'-bipiridina en un solo sistema. Por lo tanto, es posible afirmar que en este caso únicamente se presentó la formación de una especie supramolecular para el compuesto [7] (22-25).

### Espectroscopia RMN <sup>31</sup>P

En el espectro del cuadrado supramolecular de níquel [7], se observa una señal en (30,571 ppm), correspondiente a los átomos de fósforo presentes en la estructura del dppe [2] quelatando al Ni(II) (Figura 5).

Al comparar el desplazamiento químico de la señal del complejo [5] (57,256 ppm) con el desplazamiento de la señal para [7], se observa un corrimiento hacia campo alto, esto indica que al sustituir los aniones trifluorometanosulfonato ( $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ) por los ligandos 4,4'-bipiridina, la protección electrónica sobre los átomos de fósforo aumenta. Esto se debe a que los aniones trifluorometanosulfonato, actúan como bases de Lewis débiles. Por lo tanto, al estar coordinados al níquel(II), retiran densidad electrónica del sistema; es por esto que se aprecia una gran desprotección del fósforo en el complejo [5]. Caso contrario se presenta cuando estos aniones se encuentran como contraiones en el autoensamblaje [7], donde el fósforo recupera parte de su protección electrónica, debido a que el ligando [6] cede parte de su densidad electrónica al sistema supramolecular.

Los valores de RMN <sup>31</sup>P reportados por Posada (13) para el autoensamblaje con Pd(II) son mayores (66,57 ppm y 68,17 ppm) e indican menor protección electrónica sobre los átomos de fósforo. Ello significa que al aumentar el tamaño del metal en el sistema supramolecular, se hace más difícil la retrodonación electrónica para los átomos de fósforo en el dppe [2].

En el 2007, Byabartta *et al.* (18) reportaron una única señal de 49,05 ppm para RMN <sup>31</sup>P del compuesto [7]. Sin embargo, gráficamente en el espectro se hallan dos señales para RMN <sup>31</sup>P (49,05 ppm y 32 ppm) generando inconsistencias en la veracidad de esta información, dado que según el espectro reportado existirían dos especies supramoleculares. Además, estos autores no aislaron el precursor [5], ni tampoco reportaron su caracterización.

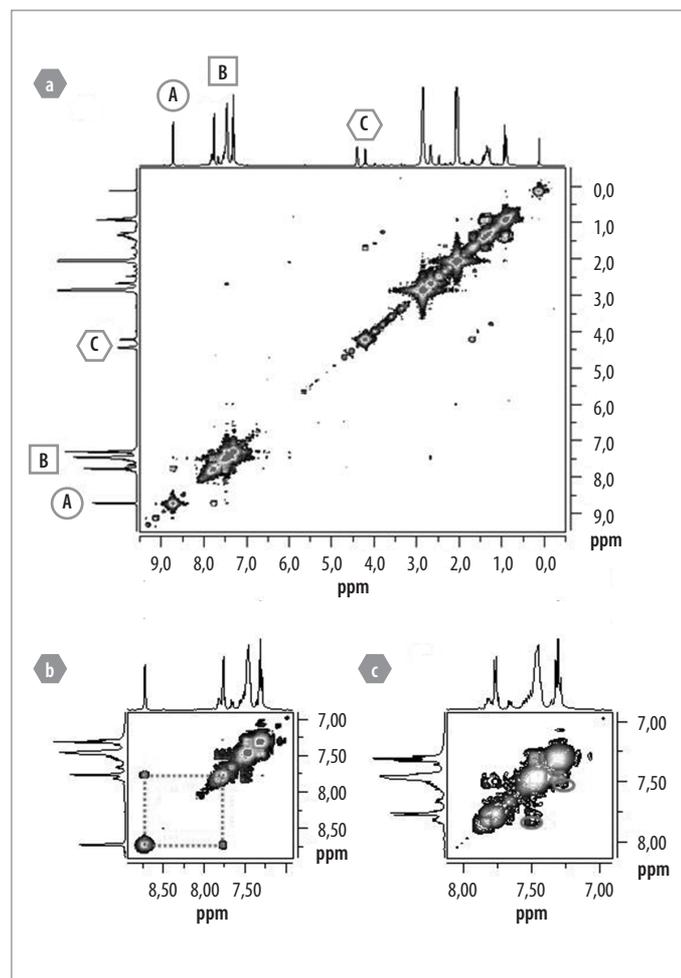


Figura 4. Espectro de correlación homonuclear COSY: <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H(acetona-d<sub>6</sub>, 400 MHz) para el cuadrado supramolecular [7].

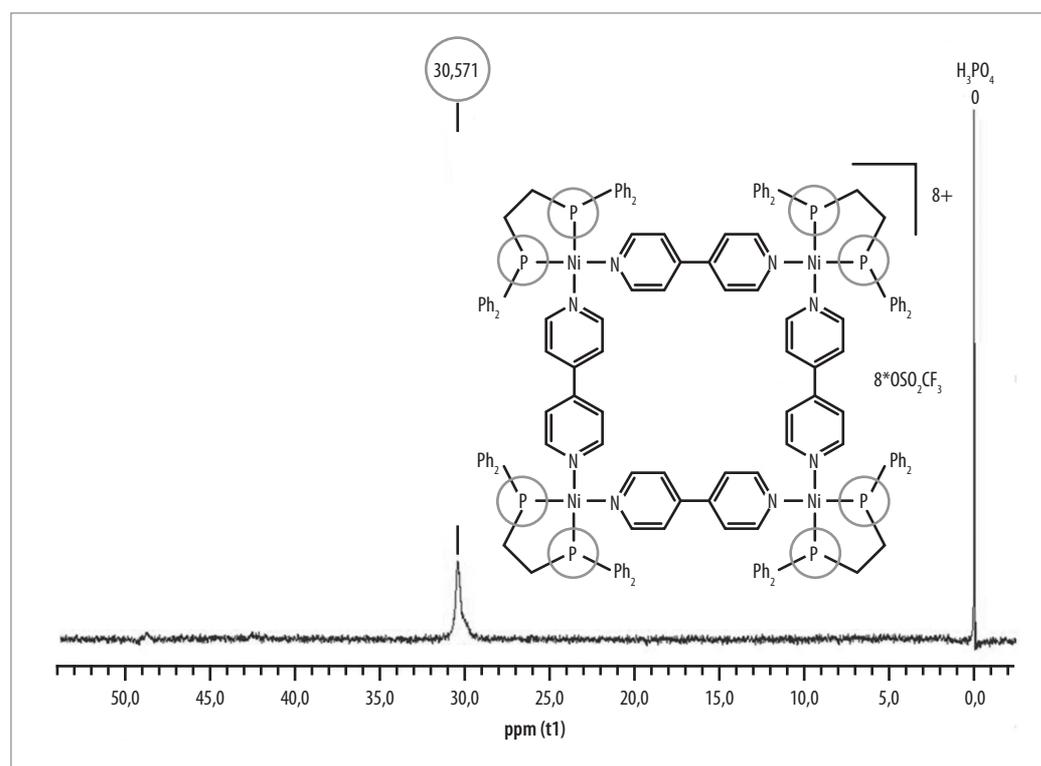
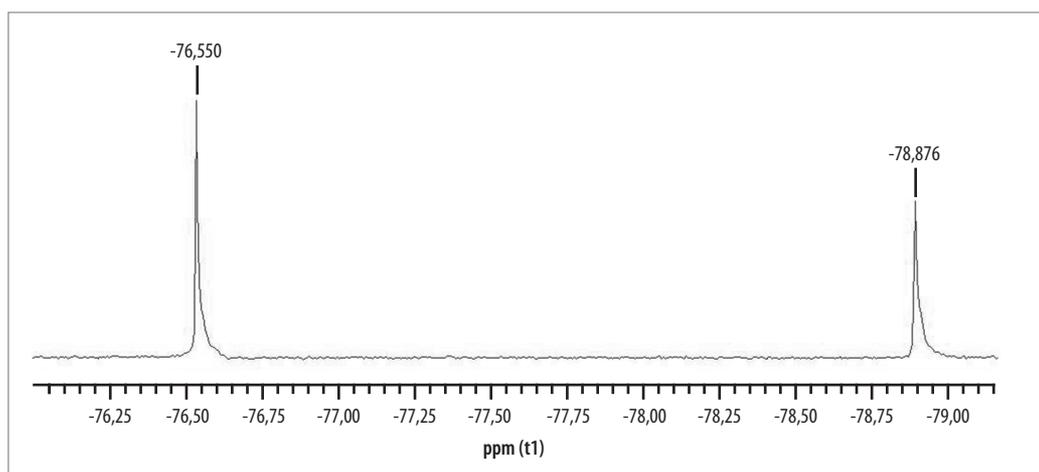


Figura 5. Espectro RMN <sup>31</sup>P correspondiente al cuadrado supramolecular de níquel [7] (acetona d<sub>6</sub>, 162 MHz).

**Figura 6.** Espectro  $^{19}\text{F}$  RMN correspondiente al cuadrado supramolecular de níquel [7] (acetona  $d_6$ , 282 MHz).



## Espectroscopia RMN $^{19}\text{F}$

El cuadrado supramolecular [7] presenta una única banda ubicada en (-78,87 ppm), la cual indica que todos los aniones trifluorometanosulfonato ( $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ) se hallan en un entorno químico idéntico y además actuando como contraiones de la entidad supramolecular. El hecho de permanecer como contraiones en la especie [7], no implica un enlace formal dentro de la entidad sino una estabilización de cargas en el sistema, afirmación puede ser soportada desde el desplazamiento químico del anión trifluorometanosulfonato en disolución (-78,40 ppm) (Figura 6).

El valor de RMN  $^{19}\text{F}$  reportado para el autoensamblaje con Pd(II) (-77,74 ppm) (13), indica que para el caso del autoensamblaje de níquel(II), los átomos de flúor están ligeramente más protegidos electrónicamente; ello probablemente se deba a la situación presentada por el equilibrio de las formas poligonales en el autoensamblaje de Pd(II). Los cuales después de la sustitución y el subsiguiente proceso de coordinación por parte de la 4,4'-bipiridina, quedan ubicados fuera de la esfera de coordinación del cuadrado supramolecular [7].

Debido a la baja solubilidad que presenta el compuesto [5], se hizo difícil la obtención de espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN. En la investigación de este tipo de estructuras se hace necesario obtener espectros de masas, situación que aun no se ha logrado para el compuesto [7].

Finalmente, con base en los reportes de Ekkenhardt *et al.* (17) y de Kramer *et al.* (28), para la síntesis de macrociclos construidos a partir de complejos metálicos de níquel(II), en donde se presentan sus estructuras mediante difracción de rayos X, es posible afirmar que la geometría de coordinación alrededor de los átomos de níquel en la estructura del cuadrado [7] sea de tipo cuadrado-planar, al igual que en el complejo precursor [5].

En el presente trabajo se ha realizado un minucioso análisis acerca del ensamblaje supramolecular de níquel (II) [7], donde se han asignado distintos parámetros espectroscópicos de manera puntual y clara. Es por esto, que estos resultados son pertinentes ya que contrastan o complementan, en cierta manera, lo que ya ha sido publicado por Byabartta *et al.* (18), quienes presentan diversas inconsistencias y no representan resultados confiables y susceptibles de ser contrastados con los encontrados en esta investigación.

## Conclusión

Se desarrolló la síntesis y caracterización (FT-IR, Raman, UV, análisis elemental, RMN:  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$ ) del cuadrado supramolecular de níquel(II) [7], el cual fue obtenido usando como bloques de construcción comple-

jos metálicos de níquel con dppe. Este macrociclo fue construido gracias al proceso de auto-ensamblaje entre el complejo  $[\text{Ni}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2(\text{dppe})]$  [5] y el ligando orgánico 4,4'-bipiridina [6]; en el cual se logró determinar de acuerdo a la simetría y la posición de las señales generadas, la formación de una sola especie supramolecular, mediante análisis de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{P}$  y COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .

## Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia, a Óscar Morales (Purdue University, E.U.A.) y al profesor Eliseo Avella (Universidad Nacional de Colombia).

## Referencias

1. Cook, T. R.; Zheng, Y. R.; Stang, P. J. Metal–Organic Frameworks and self-assembled supramolecular coordination complexes: comparing and contrasting the design, synthesis and functionality of Metal–Organic Materials. *Chem. Rev.* 2013. **113**: 734–777.
2. Murase, T.; Peschard, S.; Horiuchi, S.; Nishioka, Y.; Fujita, M. Remote chiral transfer into [2+2] and [2+4] cycloadditions within self-assembled molecular flasks. *Supram. Chem.* 2011. **23**(3–4): 199–208.
3. Suzuki, K.; Takao, K.; Sato, S.; Fujita, M. Coronene Nanophase within Coordination Spheres: Increased Solubility of  $\text{C}_{60}$ . *J. Am. Chem. Soc.* 2010. **132**: 2544–2545.
4. Dolain, C.; Hatakeyama, Y.; Sawada, T.; Tashiro, S.; Fujita, M. Inducing  $\alpha$ -Helices in Short Oligopeptides through Binding by an Artificial Hydrophobic Cavity. *J. Am. Chem. Soc.* 2010. **132**: 5564–5565.
5. Suzuki, K.; Takao, K.; Sato, S.; Fujita, M. The Precise Synthesis and Growth of Core–Shell Nanoparticles within a Self-Assembled Spherical Template. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011. **50**: 4858–4861.
6. Stang, P. J.; Chakrabarty, R.; Mukherjee, P. Supramolecular Coordination: Self-Assembly of Finite Two- and Three-Dimensional Ensembles. *Chem. Rev.* 2011. **111**: 6810–6918.
7. Zheng, Y.; Northrop, B.; Yang, H.; Zhao, L.; Stang, P. J. Geometry directed Self-Selection in the coordination-driven Self-Assembly of irregular supramolecular polygons. *J. Org. Chem.* 2009. **74**: 3554–3557.
8. Würthner, F. Perylene bisimide dyes as versatile building blocks for functional supramolecular architectures. *Chem. Commun.* **2004**: 1564–1579.
9. Stricklen, P.; Volcko, E.; Verkade, J. Novel homo and heterometallic coordination macrocycles. *J. Am. Chem. Soc.* 1983. **105**: 2494.

10. Fujita, M.; Yazaki, J.; Ogura, K. Preparation of a macrocyclic polynuclear complex, [(en) Pd (4,4'-bpy)]<sub>4</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>8</sub>, which recognizes an organic molecule in aqueous media. *J. Am. Chem. Soc.* 1990. **112**: 5645-5647.
11. Stang, P. J.; Whiteford, J. Mixed, neutral-charged, Platinum-Platinum and Platinum-Palladium macrocyclic tetranuclear complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 1994. **94**: 2313.
12. Sato, S.; Ishido, Y.; Fujita, M. Remarkable stabilization of M<sub>12</sub>L<sub>24</sub> spherical frameworks through the cooperation of 48 Pd(II)-Pyridine interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2009. **131**: 6064-6065.
13. Posada, J.; Duarte, A.; Avella, E.; Echegoyen, L. Síntesis y caracterización de un cuadrado supramolecular a partir del auto-ensamblaje del complejo [1,2-bis(difenilfosfino)etano] bistrifluorometanosulfonato paladio(II) y 4,4'-bipiridina. *Rev. Colomb. Quím.* 2011. **40**(3): 293-304.
14. King R. B. (ed.). *Encyclopedia of inorganic chemistry*. 2nd. edition. Chichester (England): John Wiley & Sons. 2005.
15. Kramer, R.; Kovbasyuk, L.; Pritzkow, H. Encapsulation of nitrate by a self-assembled tetranickel(II) complex. *New J. Chem.* 2002. **26**: 516-518.
16. Manoj, E.; Prathapachandra, M.; Fun, H. K.; Punnoose, A. Self-assembled macrocyclic molecular squares of Ni(II) derived from carbohydrazones and thiocarbohydrazones: Structural and magnetic studies. *Polyhedron*. 2007. **26**: 4451-4462.
17. Ekkehardt, H. F.; Radloff, C.; Pape, T.; Hepp, A. Nickel(II)-cornered molecular rectangle with biscarbene and 4,4'-bipyridine bridging groups. *Organometallics*. 2008. **27**: 6408-6410.
18. Byabartta, P.; Laguna, M. Gold(I)-nickel(II)-4,4'-bipy-phosphine complexes: synthesis and multinuclear NMR study. *J. Chin. Chem. Soc.* 2007. **54**: 1277-1286.
19. Hong, M.; Zhao, Y.; Su, W.; Cao, R.; Fujita, M.; Zhou, Z.; Chan, A. A Nanometer-Sized Metallosupramolecular Cube with Oh Symmetry. *J. Am. Chem. Soc.* 2000. **122**: 4819-4820.
20. Liu, Y.; Kravtsov, V.; Walsh, R. D.; Poddar, P.; Srikanth, H.; Eddaoudi, M. Directed assembly of metal-organic cubes from deliberately pre-designed molecular building blocks. *Chem. Commun.* 2004: 2806 - 2807.
21. Van Hecke, G.; Horrocks, W. Syntheses, crystal structure and spectroscopic characterization of novel 1,2-bis (diphenylphosphine) ethane (N-R-sulfonyldithiocarbamate) nickel (II). *Inorg. Chem.* 1966. **5**: 1968-1974.
22. Fochi, F.; Jacopozzi, P.; Wegelius, E.; Rissanen, K.; Cozzini, P.; Marastoni, E.; Fiscaro, E.; Manini, P.; Fokkens, R.; Dalcanele, E. Self-assembly and anion encapsulation properties of cavitand-based coordination cages. *J. Am. Chem. Soc.* 2001. **123**: 7539-7552.
23. Cano C. Síntesis y caracterización de [1,2bis(difenilfosfino)etano] bis(triflato)-níquel(II) para la construcción de ensamblajes supramoleculares. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. 2012.
24. Torres P. Síntesis y caracterización de polígonos supramoleculares, autoensamblados a partir de complejos de níquel, paladio, y platino con 4,4'-bipiridina. Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. 2014.
25. Stang, P. J.; Cao, D.; Sato, S.; Arif, A. Self-Assembly of cationic, tetranuclear, Pt (II) and Pd (II) macrocyclic squares. X-ray crystal structure of [Pt<sub>2</sub>+(dppp)(4,4'-bipyridyl)<sub>2</sub>-OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>]<sub>4</sub>. *J. Am. Chem. Soc.* 1995. **117**: 6213-6283.
26. Workman, J.; Weyer, L. *Practical Guide to Interpretive Near Infrared Spectroscopy*. FLD: CRC Press. Taylor & Francis Group. Chapter 8, pp. 77-85. 2008.
27. Milton Franklin Benial, A.; Ramakrishnan, V.; Murugesan, R. Infrared and laser studies of [Ni(II)(dppe)Cl<sub>2</sub>] and [Co(III)(dppe)Cl<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (dppe=1,2-bis(diphenylphosphino)ethane). *Spectrochimica Acta Part A*. 2002. **58**: 1703-1712.
28. Kramer, R.; Kovbasyuk, L.; Pritzkow, H. Encapsulation of nitrate by a self-assembled tetranickel(II) complex. *New J. Chem.* 2002. **26**: 516-518.

**Article citation:**

Torres Palacio, P.; Cano Benítez, C. A.; Duarte Ruiz, A. Autoensamblaje de un cuadrado supramolecular a partir del complejo [Ni(dppe)(TOF)<sub>2</sub>] con 4,4'-bipiridina. *Rev Colomb Quim.* 2013. **42**(2): 48-55.



La *Revista Colombiana de Química* es una publicación científica arbitrada del Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Acepta contribuciones provenientes de investigación en las diversas áreas de la química. El contenido de los artículos debe ser original, inédito y no debe haber sido enviado, total o parcialmente, para publicación a otra revista. La redacción asume el derecho de reproducción de los trabajos aceptados. Su publicación en otro medio requiere permiso del editor.

Solamente se publicarán contribuciones consideradas como resultados de trabajos de investigación, no se incluirán revisiones bibliográficas, ni notas breves.

La aceptación de los trabajos para publicación en la *Revista Colombiana de Química* depende de las evaluaciones del Comité Editorial y de los conceptos de especialistas en el tema, para lo cual se utiliza un sistema de "doble ciego". Los manuscritos que no se ajusten a la temática o al estilo de la revista serán devueltos sin pasar a evaluación.

## Requisitos para el envío de manuscritos

- La *Revista Colombiana de Química* acepta contribuciones en inglés y en español.
- Todas las secciones del artículo se presentarán en formato .doc o .docx, a doble espacio, con letra Times New Roman (tamaño 12 puntos) en páginas tamaño carta. Todas las páginas deben estar numeradas.
- Las gráficas, fotos y figuras deben adjuntarse en un archivo aparte, en formatos TIFF o JPG, al tamaño en que van a salir, con 300 dpi de resolución, y en escala de grises o en blanco y negro en caso de que estén en color y no se vaya a imprimir así; en caso de que tengan 4 o más colores de uso obligatorio, se debe cambiar la escala de grises por diferentes tramas. No se deben insertar en el documento del manuscrito ya que pierden la resolución, y en el programa de diseño van a salir pixeladas. Si las gráficas corresponden a archivos trabajados en hojas de cálculo (p. ej. MS Excel) o procesador de textos (p. ej. MS Word), se deben enviar en los formatos originales (.xls, .doc, etc.), pero abiertas, no como imagen para que se puedan editar.
- Adjunte una carta de presentación y aceptación de autoría firmada por los investigadores involucrados. Los autores podrán sugerir los nombres de tres posibles árbitros con sus respectivas direcciones electrónicas.
- Los manuscritos en formato .doc o .docx, junto con la carta de presentación pueden ser enviados a las siguientes direcciones de correo electrónico: rcolquim\_fcboq@unal.edu.co.

## Nota de Copyright

Una vez que un artículo es aceptado para su publicación, el autor está de acuerdo en que la revista se publicará On-Line bajo los términos de una licencia Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 Unported License.

## Forma y organización del artículo

Los trabajos para publicación deben incluir:

- **Título.** Debe ser conciso, consistente con el trabajo y de ser posible no contener fórmulas ni abreviaturas.  
El título se debe escribir en español, centrado y en mayúsculas; en renglón aparte, la versión del título en inglés y después la versión del título en portugués. Si el manuscrito está en inglés, el título en este idioma aparecerá en primer lugar.
- **Nombre de los autores y filiación institucional.** Se debe incluir el primer nombre, la inicial del segundo nombre y el primer apellido de todos los autores. Indique las filiaciones institucionales con un número arábigo en superíndice escrito inmediatamente después del nombre de cada autor y en frente de la dirección apropiada.  
Las filiaciones institucionales deben incluir la dirección postal completa y en la del autor correspondiente debe adicionarse el correo electrónico y el número telefónico.
- **Resumen y palabras clave.** En el resumen tipo analítico, preferiblemente en un solo párrafo, con una extensión no mayor a 180 palabras, deben mencionarse los propósitos de la investigación, los resultados relevantes (proporcionando datos específicos y, de ser posible, su significación estadística), y las conclusiones principales sin incluir citas bibliográficas. Se debe hacer énfasis en los aspectos nuevos e importantes del estudio.  
Al final del resumen se deben escribir de 3 a 6 palabras clave que ayuden a clasificar el artículo.  
Incluya la versión del resumen y de las palabras clave tanto en inglés (abstract) como en portugués (resumo).
- **Introducción.** Describa el planteamiento general del tema, dando la información necesaria en forma concisa y precisa haciendo referencia solamente a la bibliografía directamente relacionada, considerada indispensable para el desarrollo del tema y que permita conocer el estado actual del mismo. Expresé con claridad los objetivos principales y secundarios del trabajo y no incluya datos ni conclusiones del trabajo que está dando a conocer.
- **Materiales y métodos.** Si existen secciones diferenciadas, deben indicarse mediante encabezados pertinentes (p. ej. muestreo, preparación de la muestra, etc.). Las fuentes y estado de pureza de los materiales y reactivos químicos y la descripción de equipos solo se debe incluir cuando estos sean específicos o novedosos. La descripción de la experimentación debe hacerse con los detalles suficientes para que otros investigadores puedan repetirla. La descripción de procedimientos descritos en la literatura debe evitarse, a menos que hayan sido modificados, en cuyo caso deben incluirse los detalles de la modificación.
- **Resultados y discusión.** Los resultados y discusión deben presentarse de forma precisa incluyendo, si da a lugar, tablas y figuras. No se debe presentar la información en ambas formas. La discusión debe ser breve y enfocada a la interpretación de los resultados experimentales, incluidas sus limitaciones e implicaciones para investigaciones futuras. Relacione las observaciones con otros estudios pertinentes.

- **Conclusiones.** Presente las conclusiones más relevantes considerando los objetivos del trabajo y oriente sobre posibles vías para continuar la investigación o el estudio emprendido. Absténgase de hacer afirmaciones generales y extraer conclusiones que no estén respaldadas por los datos. No cite referencias bibliográficas en esta sección.
- **Referencias bibliográficas.** Numere las referencias consecutivamente en el orden en que son mencionados por primera vez en el texto. Identifique las referencias en el texto con números arábigos y en paréntesis, por ejemplo, (11). Las referencias bibliográficas deben ir al final con su respectiva numeración en el siguiente formato:
  1. **Artículos de revista.** Apellidos de todos los autores e inicial del nombre, título completo del artículo, nombre de la revista (preferiblemente abreviado), año, volumen y páginas. Para el nombre abreviado puede consultar el servicio del Chemical Abstracts en: <http://cassi.cas.org/search.jsp>
    - Paniandy, J.; Chane-Ming, J.; Pieribattesti, J. Chemical composition of the essential oil and headspace solid-phase microextraction of the guava fruit (*Psidium guajava*, L.). *J. Essent. Oil Res.* 2000. **12**: 153–158.
  2. **Libros:** Apellidos e inicial del nombre de los autores, título del libro, ciudad, editorial, páginas, año de publicación.
    - Skoog, D.; Holler, F.; Crouch, S. Principios de análisis instrumental. 6ª. ed., México, D. F.: Cengage Learning. pp. 20-34. 2008.
  3. **Capítulo de libro:** apellidos e inicial del nombre de los autores del capítulo, seguido de la palabra En: título del libro, apellidos e inicial del editor del libro, ciudad, editorial páginas, año de publicación.
    - Ferst, A. The three-dimensional structure of proteins. En: Structure and mechanism in protein science. Pelletier, S. (editor). New York: W.H. Freeman and Company. pp. 1-50. 2003.
  4. **Patente:**
    - Davis, R. U.S. Patent 5,708,591, 1998.
  5. **Referencias de Internet.** Cuando se usan versiones electrónicas se debe incluir la URL donde se encuentra disponible el documento y la fecha en la cual se consultó por última vez:
    - Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia. 2011. Disponible en: [http://www.minagricultura.gov.co/archivos/agenda\\_prospectivainvestigación\\_y\\_desarrollo\\_tecnológico\\_paralacadena\\_productiva\\_de\\_flores\\_y\\_follajes\\_con\\_énfasis\\_en\\_clavel](http://www.minagricultura.gov.co/archivos/agenda_prospectivainvestigación_y_desarrollo_tecnológico_paralacadena_productiva_de_flores_y_follajes_con_énfasis_en_clavel). [Consultado el 7 de abril de 2011].

## Requisitos de los manuscritos

- **Nomenclatura, unidades y abreviaturas** Deben emplearse nomenclaturas y símbolos aceptados internacionalmente y reconocidos por la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) y unidades de medida del Systeme International d'Unités (SI). Cuando se incluyen datos analíticos debe indicarse el número de repeticiones así como la desviación típica de los resultados u otra magnitud que indique la reproducibilidad de los mismos. Escribir las fórmulas de forma clara, prestando especial atención a la colocación de los sub y superíndices.
 

Cuando se utilice por primera vez una abreviatura, irá precedida del término completo al que corresponde, salvo si se trata de unidades de medida común, por ejemplo: dicroísmo circular (DC).

El nombre de las enzimas no debe abreviarse, exceptuando las abreviaturas comunes como ATPasa. En lo posible para las enzimas utilice los números E.C. y las recomendaciones del Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) [www.chem.qmw.ac.uk/iubmb](http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb)),
- **Caracterización de compuestos.** Los datos físicos y espectroscópicos para compuestos nuevos deben presentarse en el siguiente orden: nombre del compuesto y el número asignado en el texto; estado físico del compuesto (cristal, líquido, etc.), constantes físicas: punto de fusión/punto de ebullición; rotación óptica y medidas de dicroísmo circular si es ópticamente activo; UV; IR, RMN- 1H; RMN -13C; EM.
 

Los datos de RMN y espectrometría de masas se presentarán completos solo si estos no han sido publicados anteriormente en tal caso solo las referencias más relevantes deben mostrarse. La presentación de los datos de espectrometría de masas debe seguir las recomendaciones dadas en *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*. 1995. **142**: 211-240 y deben indicar el método utilizado (EM (IE), EM (IQ), CG-EM, etc.) y la energía de ionización.
- **Tablas, figuras y ecuaciones.** Las tablas y figuras deben estar citadas en el texto, ennumeradas con números arábigos en el orden de aparición en el texto. Las tablas deben estar encabezadas por un título breve e informativo; en el caso de las figuras la leyenda respectiva se coloca debajo.
 

Las ecuaciones se numeran a la derecha, utilizando números arábigos consecutivos que se escriben entre paréntesis cuadrados, p. ej.: [eq. 1].

## Costo de la publicación

La publicación de un artículo, con una extensión no mayor a 5 páginas impresas de la revista, tendrá un costo en pesos colombianos, equivalente a 150 dólares. Las páginas adicionales tendrán un costo equivalente a 10 dólares cada una. El autor recibirá 10 copias (*reprints*) del artículo impreso.