

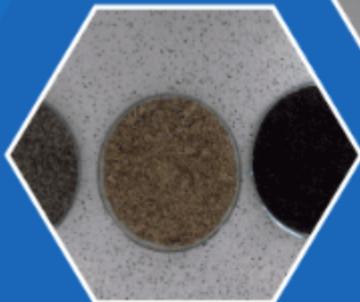
R C Q

Volumen 45, nro. 2 de 2016/ ISSN 0120-2804

Revista Colombiana de Química



**Nanostructured MnO₂
catalyst in *E. crassipes*
(water hyacinth) for indigo
carmine degradation**

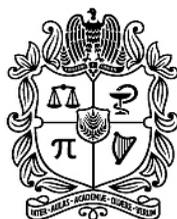


UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**Revista
Colombiana
de Química**

Volumen 45, No. 2, mayo - agosto de 2016



**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)
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_fcboq@unal.edu.co

Consulta Open Access

<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

Director Revista

Carlos Eduardo Narváz Cuenca, Ph. D., Universidad Nacional de Colombia.

Comité Editorial

Cristian Blanco Tirado, Ph. D., Universidad Industrial de Santander, Colombia.
Francisco Carrasco Marín, Dr. Sc., Universidad de Granada, España.
Leonardo Castellanos 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 de Lund, Suecia.

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 USD \$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 Colombiana de Química.

Para canjes dirigirse al SINAB: biblioteca_bog@unal.edu.co ó cevelascozaza@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. La redacción asume el derecho de reproducción de los trabajos aceptados. Su publicación en otro medio requiere permiso del editor. La revista es dirigida a estudiantes y profesionales relacionados con cualquier área de la química.

Preparación editorial

Camila Alejandra Rincón Carrillo, asistente editorial.
Sindy Tatiana Bedoya Mesa, asistente editorial.
Coordinación de Publicaciones.
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.
Cuidado editorial: Camila Alejandra Rincón Carrillo, Sindy Tatiana Bedoya Mesa.
Diseño y maquetación: Camila Alejandra Rincón Carrillo, Sindy Tatiana Bedoya Mesa.
Impresión y encuadernación: Proceditor Ltda.

Carta del editor Editor's letter	1-4
Química Orgánica y Bioquímica	
Determinación del contenido extra e intracelular de algunas enzimas líticas relacionadas con pared celular en raíces de clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) Determination of extra and intracellular content from some lytic enzymes related with carnation (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) root cell wall Determinação do conteúdo extra e intracelular de algumas enzimas líticas relacionadas com a parede celular em raízes de cravo (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) <i>Edilene Ramírez, Sixta T. Martínez</i>	5-11
Química Aplicada y Analítica	
Implementación y evaluación de una nariz electrónica para la detección de alcoholes lineales Implementation and evaluation of an electronic nose for the alcohols detection Implementação e avaliação de um nariz eletrônico para detectar álcoois lineares <i>Ana Lucía Paredes-Doig, María del Rosario Sun Kou, Gino Picasso-Escobar, Elizabeth Doig-Camino, Germán Comina-Bellido</i>	12-18
Caracterización química de material particulado PM ₁₀ en la atmósfera de La Guajira Colombia Chemical characterization of particulate matter PM ₁₀ in Guajira Colombia atmosphere Caracterização química do material particulado PM ₁₀ na atmosfera da Guajira Colombia <i>Carlos Doria Argumedo, Juan Fagundo Castillo</i>	19-29
Nanostructured MnO ₂ catalyst in <i>E. crassipes</i> (water hyacinth) for indigo carmine degradation Catalizador de MnO ₂ nanoestructurado en <i>E. crassipes</i> (jacinto de agua) para la degradación de índigo carmín Catalisador de MnO ₂ nanoestructurado em <i>E. crassipes</i> (jacinto da água) para a degradação do índigo carmin <i>Tatiana Cuervo Blanco, César A. Sierra, Hugo R. Zea</i>	30-38
Microencapsulación mediante secado por aspersión de aceite de mora (<i>Rubus glaucus</i>) extraído con CO ₂ supercrítico Microencapsulation by spray drying of blackberry (<i>Rubus glaucus</i>) oil extracted with supercritical CO ₂ Microencapsulação por secagem por atomização de óleo de amora (<i>Rubus glaucus</i>) extraído com CO ₂ supercrítico <i>Paola M. Figueroa, Miguel A. Ceballos, Andrés M. Hurtado</i>	39-47
Caracterización de los compuestos del aroma en rones colombianos por HS-SPME-GC-MS-O Characterization of aroma compounds in Colombian rums by HS-SPME-GC-MS-O Caracterização de compostos de aroma em rum colombiano por HS-SPME-GC-MS-O <i>Jazmín Osorio Monsalve, Carlos López, Julián Zapata</i>	48-54
Guía para autores Guide for authors	55-64

El segundo número del volumen 45 del año 2016 de la Revista Colombiana de Química cuenta con la participación de distintos autores nacionales e internacionales. Las contribuciones provienen de autores de Lima (Perú), La Habana (Cuba) y Riohacha, Bogotá, Pasto y Medellín (Colombia). A continuación se presenta el contenido del número.

La sección de Química Orgánica y Bioquímica cuenta con un artículo en el que se analizaron cuatro enzimas proteolíticas presentes en las paredes celulares de raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.). Estas enzimas se extrajeron por medio de dos metodologías; se comparó su eficiencia por medio de la evaluación de la actividad enzimática. El estudio propone una metodología para extraer estas cuatro enzimas de manera simultánea.

La sección de Química Aplicada y Analítica cuenta con cinco artículos. En el primero de ellos se desarrolló una nariz electrónica simple basada solo en cuatro sensores de gas de SnO₂, que permite detectar y clasificar alcoholes de manera eficiente, incorporando el análisis estadístico de componentes principales (PCA). En el segundo artículo se estudió la composición química del material particulado PM₁₀ encontrado en La Guajira-Colombia; se encontró que las causas principales de la presencia de este son el aerosol marino, la actividad agrícola, pecuaria y minera. En el tercer artículo se analizó la eficiencia del material vegetal procesado del jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), empleado como soporte para catalizadores nanométricos de MnO₂ para la degradación del colorante carmín; estas nanopartículas mostraron una eficiencia de 97,6% en la eliminación del índigo carmín en 5 min. En el cuarto artículo se extrajo y se microencapsuló aceite de la semilla de la mora (*Rubus glaucus*) mediante secado por aspersión, para evitar la degradación temprana de este y prolongar su vida útil.

Finalmente, el último artículo identifica los principales compuestos presentes en tres clases de roncs comerciales de Colombia a través de microextracción en fase sólida en modo espacio de cabeza (HS-SPME), acoplada a cromatografía de gases con detectores de espectrometría de masas y olfatometría (GC-MS-O); se encontraron ésteres, compuestos aromáticos, alcoholes, acetales, entre otros compuestos que confieren características odorantes.

The second issue of volume 45 of 2016 of Revista Colombiana de Química has the participation of different national and international authors. The contributions come from authors from Lima (Peru), La Habana (Cuba) and from Riohacha, Bogota, Pasto, and Medellin (Colombia). Here are the contents of the issue, published according to their subject.

The section of Organic Chemistry and Biochemistry has one article in which four proteolytic enzymes, present in cell wall of carnation roots (*Dianthus caryophyllus* L.), were analyzed. These enzymes were extracted through two methods; efficiency of extraction was compared by evaluating enzyme activity. The study proposes a methodology to extract these four enzymes simultaneously.

The section of Section of Applied and Analytical Chemistry has five articles. In the first of them an electronic nose based only on four SnO₂ gas sensors, which can detect and classify alcohols efficiently, incorporating statistical principal component analysis (PCA), was developed. In the second article the chemical composition of particulate matter PM₁₀, found in La Guajira-Colombia, was studied; it was found that the main causes of PM10 presence are the marine aerosol, agricultural, livestock and mining activity. In third article the efficiency of plant material processed water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), used as support for nanometric MnO₂ catalysts for carmine dye degradation, was analyzed; these nanoparticles showed a 97.6% efficiency removing indigo carmine in 5 min. In the fourth article, oil seed blackberry (*Rubus glaucus*) was extracted and microencapsulated by spray drying to prevent early degradation and extend its useful life.

Finally, the last article identifies the main compounds in three kinds of commercial rums from Colombia, through solid phase microextraction headspace (HS-SPME), coupled to gas chromatography detectors mass spectrometry and olfactometry mode (GC-MS-O); esters, aromatics, alcohols, acetals, were found among other compounds, which provide odorant features.



Determinación del contenido extra e intracelular de algunas enzimas líticas relacionadas con pared celular en raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.)

Resumen

En el presente trabajo se verificó la presencia de algunas enzimas relacionadas con la pared celular vegetal (poligalacturonasa, pectato liasa, proteasa y xilanasa) en raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.). Así mismo, se determinaron los niveles de actividad de las mismas. Estos niveles se analizaron en diferentes espacios celulares: en el fluido intercelular que hace parte del apoplasto, en el simplasto y en el tejido total de las raíces de clavel (apoplasto y simplasto).

Para extraer el fluido intercelular, se ensayaron dos metodologías. Para obtener el contenido intracelular (simplasto) y el extracto total (apoplasto y simplasto) en raíces de clavel se ensayaron tres metodologías que utilizaban como solución i) extractante buffer fosfato, ii) buffer fosfato con PVPP y iii) lavados con acetona a las raíces de clavel, antes de la extracción con buffer fosfatos. Los resultados mostraron el efecto de las diferentes soluciones en las actividades enzimáticas y en el contenido de proteína. Se propuso una de estas metodologías para extraer las cuatro enzimas en un único paso y realizar análisis comparativo de actividad enzimática.

Palabras clave: fluido intercelular, extracto intracelular, actividad enzimática, poligalacturonasa, pectato liasa, proteasa, xilanasa.

Determination of extra and intracellular lytic enzymes related with carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) root cell wall

Abstract

The presence of some enzymes related to cell wall (polygalacturonase, the pectate lyase, protease and xylanase) in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) roots as well as the activity levels were determined. These levels were analyzed in different cellular places: the intercellular fluid that is part of the apoplast, the symplast, and the total level (apoplast and symplast) in carnation roots.

Two methods were tested to extract the intercellular fluid. To obtain the intracellular content (symplast) and total extract (apoplast+symplast), three methods were tested, using as extracting solution i) phosphate buffer, ii) phosphate buffer + PVPP, iii) before the extraction with phosphate buffer, the carnation roots were washed with acetone. The results showed the effect of different extracting solutions in the enzymatic activities and in the protein content. A new only one step method is proposed to extract the four enzymes and make the comparative analysis of enzymatic activity.

Keywords: intercellular fluid, intracellular extract, enzymatic activity, polygalacturonase, pectate lyase, protease, xylanase.

Determinação do conteúdo extra e intracelular de algumas enzimas líticas relacionadas com a parede celular em raízes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.)

Resumo

No presente trabalho foi evidenciada a presença de algumas enzimas relacionadas com a parede celular vegetal: poligalacturonasa, pectato liasa, proteasa e xilanasa e se determinaram seus níveis de atividade, em raízes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). Os níveis se analisaram em diferentes espaços celulares: no fluido intercelular que faz parte do apoplasto, no simplasto e no tecido total das raízes de cravo (apoplasto e simplasto). Foram avaliadas duas metodologias para extrair o fluido intercelular.

Para obter o conteúdo intracelular (simplasto) e o extrato total (apoplasto e simplasto) se avaliaram três metodologias que utilizavam como solução extratora i) buffer fosfato, ii) buffer fosfato com PVPP e iii) lavados com acetona às raízes de cravo, antes da extração com buffer fosfato. Os resultados mostraram o efeito das diferentes soluções nas atividades enzimáticas e no conteúdo de proteína. Se propõem uma de estas metodologias para extrair as quatro enzimas num único passo e realizar a análise comparativa da atividade enzimática.

Palavras-Chave: fluido intercelular, extrato intracelular, atividade enzimática, poligalacturonasa, pectato liasa, proteasa, xilanasa.

Introducción

Las células de las plantas constan de dos compartimentos separados por una membrana plasmática continua, uno intracelular, conocido como simplasto, y otro extracelular, conocido como apoplasto, compuesto por las paredes celulares, los espacios intercelulares, el fluido intracelular (IFW por sus siglas en inglés), las células muertas vacías de los tubos del xilema y el agua contenida en el mismo (1).

La pared celular de las plantas (PC) determina el tamaño y la forma de las células. Así mismo, constituye el primer obstáculo que los patógenos deben superar para acceder a ésta (2). Es una estructura altamente compleja, compuesta por polisacáridos que comprenden celulosa, hemicelulosa, pectina, proteínas y lignina, entre otras (3). De igual modo, la PC que rodea el protoplasto no es una estructura estática, sino que se remodela y reorganiza durante el crecimiento y desarrollo de la célula. También, la PC se desarticula durante los procesos terminales como abscisión de órganos y maduración de frutos; es fuente de nutrientes y una barrera que limita el acceso de patógenos al contenido celular (4).

Así, con el fin de tener acceso a la planta, los patógenos secretan numerosas enzimas que degradan la pared celular, y que, en algunos casos, llegan a ser factores de virulencia (2, 4). En el IFW los patógenos secretan sustancias para colonizar al huésped y se dan los procesos de defensa por parte de las plantas (1, 5). Por tanto, ha sido estudiado para conocer las proteínas presentes, relacionadas y secretadas por la planta y el patógeno en el inicio de una interacción planta-patógeno (5, 6).

Específicamente para el clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), algunos estudios señalan que los hongos producen una serie de enzimas depolimerizantes que degradan la pectina presente en la PC, como consecuencia taponan los vasos del xilema y reducen el flujo vascular originando stress hídrico y en algunos casos pudrición de la planta (7). Microorganismos como los *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, secretan proteasa, xilanasa, poligalacturonasa y pectato liasa en el IFW a tiempos de infección tempranos (8). La secreción de estas enzimas líticas puede inducir una respuesta de defensa por la liberación de oligogalacturónidos de la PC de la planta (3, 9, 13).

De este modo, las enzimas líticas permiten al patógeno la penetración y expansión dentro de los tejidos vegetales y el uso de la PC como fuente de carbono. A su vez, estas enzimas son utilizadas por la planta para remodelación de la PC, entre otras funciones (4). Se han desarrollado algunas revisiones (14, 15) y se encuentra que la matriz de la PC de las plantas posee más de 20 actividades glicosil hidrolasas (GH), las cuales incluyen glicosidasas y glicanasas que hidrolizan la mayoría de enlaces glicosídicos de los polisacáridos presentes en esta.

En la clasificación por familias reportada por Franková y Fry (14), aparece en la familia GH10 la β 1-4 xilanasa, en la GH28 la endopoligalacturonasa y en la PL1 la pectato liasa. De manera general, y sin especificar un tejido en particular, estas enzimas son asociadas con expansión celular, diferenciación, maduración y reparación de pared (16). Las proteasas, por ejemplo, son reguladores clave de una variedad de procesos biológicos, se expresan en tiempos y espacios específicos y se acumulan según su función en diferentes compartimientos subcelulares (17).

Puesto que las enzimas líticas asociadas a la PC son comunes a ambos organismos (planta y hongo), pero de funciones tanto bioquímica como fisiológicamente distintas para cada una, resultan de interés en estudios de interacción huésped-patógeno (4).

Estas se han estudiado utilizando aproximaciones bioquímicas y de genética molecular. La aproximación bioquímica consiste en la extracción y posterior purificación de las enzimas de la pared celular, lo cual permite, entre otros, realizar estudios de actividad (15).

Por tanto, en el presente trabajo se siguió la aproximación bioquímica y se determinó la actividad de las enzimas proteasa (PRT), xilanasa (XL), pectato liasa (PL) y poligalacturonasa (PG) en el IFW, en el simplasto del residuo vegetal de raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), luego de extraer el fluido intercelular, y en el tejido total (IFW + simplasto). Para este propósito se ensayaron varias metodologías que permitieron la extracción de las cuatro enzimas en los diferentes espacios celulares seleccionados.

Materiales y métodos

Material Vegetal

Se emplearon raíces de esquejes de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) de tres semanas de enraizamiento. La variedad usada fue Moonlight. El material fue donado por la empresa floricultora QFC-SAS ubicada en Gachancipá.

Extracción de fluido intercelular (IFW)

Para la extracción del fluido de lavado intercelular, fueron evaluadas dos metodologías reportadas por Olivieri *et al.* (18) y Van Pelt-Heerschap (19).

Para desarrollar el procedimiento descrito por Van Pelt-Heerschap (19), denominado fluido intercelular sin vacío (IFW-SV), se utilizaron 2,5 g de raíces de clavel, se lavaron con agua destilada y se cortaron en piezas de 0,5 a 1 cm; el tejido se lavó con 5 mL de buffer tris-HCl 50 mM pH 7,5; se secó y se centrifugó durante 20 min a 2000 x g en una centrifuga (Hettich, modelo Universal 320R) empleando un tubo con un adaptador (Figura 1) que fue diseñado para permitir separar el IFW de las raíces.

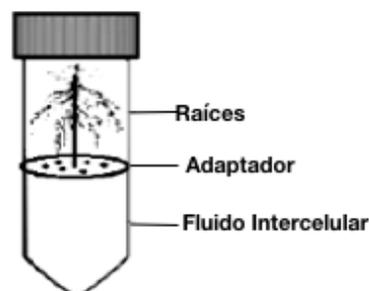


Figura 1. Tubo de centrifugación con adaptador, utilizado para separar el fluido intercelular de las raíces de clavel (*Dianthus Caryophyllus* L.)

En el procedimiento reportado por Olivieri *et al.* (18), denominado fluido intercelular con vacío (IFW-CV), se empleó la misma cantidad de material vegetal, se lavó y se cortó como se describió anteriormente. El tejido se sumergió en 5 mL de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 0,6 M y 2-mercaptoetanol 0,1% (v/v), se sometió a vacío durante tres periodos de 10 s, separados por intervalos de 30 s y se secó sobre papel filtro. La muestra se colocó en un tubo con adaptador (Figura 1) que permitió separar el IFW de las raíces, por centrifugación (Centrifuga Hettich, modelo Universal 320R) durante 20 min a 3000 x g. El fluido obtenido (1 mL) se almacenó a -20 °C.

Se realizaron cuatro réplicas para cada uno de los métodos ensayados. El contenido de proteína se cuantificó usando el método de Bradford y la linealización reportada por Zor y Selinger (20).

Una vez seleccionada la metodología para la extracción del fluido intercelular, se aplicó para obtener el extracto con el que se determinaron las diferentes actividades enzimáticas. Para lo anterior, se aumentaron a cinco las réplicas biológicas, se eliminaron los compuestos de bajo peso molecular mediante microdiálisis (Membrana SigmaD-9277. 10Kd) a 4 °C, usando buffer fosfatos 10 mM pH 6,5; realizando tres cambios cada 2 h.

Obtención de extracto intracelular (EIn)

Para la obtención del material soluble presente en el espacio intracelular (simplasto), se extrajo el IFW y en el tejido sobrante se ensayaron tres metodologías: un tratamiento que utilizó como solución extractante buffer fosfato 100 mM pH 6,5 (EIn) (21), un segundo tratamiento que usó polivinilpolipirrolidona (EIn-PVPP) (23) y finalmente uno en donde se empleó un tratamiento previo con polvos de acetona (EIn-AC) (22).

Obtención del extracto intracelular usando buffer fosfato (EIn)

Se pesaron las raíces (2,5 g), se trituraron con nitrógeno líquido y se resuspendieron en buffer fosfatos 100 mM pH 6,5 en relación 1:2 (*p/v*); se mantuvieron en agitación sobre hielo por 1 h. Finalizado el tiempo, la mezcla se centrifugó a 11000 x g por 30 min (Centrífuga Hettich, modelo Universal 320R) (21).

Obtención del extracto intracelular usando buffer fosfato más polivinilpolipirrolidona (EIn-PVPP)

Se trituraron las raíces (2,5 g) con nitrógeno líquido y se resuspendieron en buffer fosfatos 100 mM pH 6,5 con polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 1% (*p/v*), y NaCl 1 M en relación 1:2 (*p/v*), un compuesto utilizado para eliminar polifenoles y evitar así la unión de estos con las proteínas, (24); se mantuvieron en agitación sobre hielo por 1 h. Finalmente la mezcla se centrifugó a 11000 x g por 30 min (Centrífuga Hettich, modelo Universal 320R) (23).

Obtención del extracto intracelular utilizando tratamiento previo con polvos de acetona (EIn-AC)

Se trituraron las raíces (2,5 g) con nitrógeno líquido, el material vegetal se lavó tres veces con acetona a -20 °C por 1 min en una relación 1:2 (*p/v*); se resuspendió en buffer fosfatos 100 mM pH 6,5 manteniendo la misma relación de los lavados con acetona y se agitó sobre hielo por una hora. Finalmente la mezcla se centrifugó a 11000 x g por 30 min (Centrífuga Hettich, modelo Universal 320R) (22).

Una vez obtenidos los extractos con cada una de las metodologías anteriores, se eliminaron los compuestos de bajo peso molecular, mediante microdiálisis (Membrana Sigma D-9277, 10Kd) a 4 °C, usando buffer fosfatos 10 mM pH 6,5 y realizando tres cambios cada dos horas. Las muestras obtenidas se congelaron a -20 °C y se utilizaron para determinar las actividades enzimáticas y cuantificar proteína por el método de Bradford y la linealización reportada (20). Los resultados de cada tratamiento son producto de cinco réplicas biológicas.

Obtención de extractos crudos (EC)

Para obtener los extractos crudos o totales, con todo el contenido celular (IFW + simplasto), se emplearon las tres metodologías utilizadas en el paso anterior. Para obtener el extracto crudo, se utilizó todo el tejido vegetal sin extraer previamente el fluido intercelular.

Determinación de actividad α -manosidasa en el fluido de lavado intercelular (IFW) y en el extracto intracelular (EIn)

La integridad del material intracelular (5) se determinó midiendo la actividad de la enzima α -manosidasa descrita por Boller (24). Como sustrato se utilizó p-nitrofenol- α -manopiranosido 5mM, disuelto en buffer acetato 0,01M pH 4,0. Se tomaron 100 μ L, se incubaron con 20 μ L de los extractos de IFW y EIn durante 2 h a 37 °C. La reacción se detuvo con 1,1 mL de Na₂CO₃ 0,2 M y se midió la absorbancia a 420 nm. Una unidad de actividad equivale a un nmol de p-nitrofenol liberado por min. La unidad de actividad se definió como un incremento con respecto al blanco de 0,01 unidades de absorbancia a 420 nm por minuto por mL de mezcla de reacción en las condiciones del ensayo. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Determinación de actividad proteasa (PRT)

Se empleó la técnica descrita por Hübner (25), ensayo basado en la determinación de aminoácidos aromáticos de los péptidos liberados en la hidrólisis de la caseína. Se tomaron 100 μ L de extracto y 400 μ L de caseína al 0,1 % (*p/v*) disuelta en buffer Tris-HCl 0,01 M pH 8. La mezcla se incubó a 50 °C por 30 min, y la reacción se detuvo con 1 mL de ácido tricloroacético (ATA) al 10% (*v/v*). Se centrifugó por 5 min a 10000 x g, a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. El blanco enzima-sustrato, se preparó adicionando al extracto enzimático que contenía el sustrato 1 mL de ATA al 10% (*p/v*) y se realizó el mismo tratamiento. El ensayo se realizó por quintuplicado. La unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un nanomol de tirosina por segundo (nKat) en las condiciones de la reacción. La cuantificación se realizó usando una curva de calibración, elaborada con L-tirosina como patrón en concentraciones de 0 a 180 μ g/mL.

Determinación de actividad pectato liasa (PL)

La determinación de actividad se realizó usando el método reportado en Parra (26). Se tomaron 100 μ L del extracto en el que estaba presente la enzima, se le agregaron 700 μ L de ácido poligalacturónico (APG) 0,1% (*p/v*), preparado en buffer tris-HCl 0,1 M pH 8,5 con CaCl₂ 0,5 mM; la mezcla se incubó a 37 °C por 1 h. La reacción se detuvo con 1 mL de ácido clorhídrico 1 M. Finalizado el ensayo se determinó la actividad midiendo el incremento en la absorbancia a 232 nm ($\epsilon = 4600$ L/mol·cm), producido por la liberación de urónidos insaturados. La unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un nmol de urónidos insaturados liberados por segundo (nKat) en las condiciones de la reacción. Los ensayos fueron realizados cinco veces.

Determinación de actividad poligalacturonasa (PG)

Para la cuantificación de los azúcares reductores obtenidos como productos de hidrólisis de la enzima PG sobre el sustrato ácido poligalacturónico (APG), se empleó el método de Nelson-Somogyi (27, 28). La cuantificación de los azúcares liberados se realizó por medio de una curva de calibración, usando como patrón glucosa en el rango de 0-30 μ g/mL (26, 27). La medida de actividad de la enzima se realizó usando la siguiente mezcla de reacción: 100 μ L de extracto enzimático, 250 μ L de APG 0,3% (*p/v*) en ácido acético-acetato de sodio 0,1 M pH 5,0; la mezcla de reacción fue incubada a 30 °C por 1 h (26). La unidad de actividad PG fue definida como nmoles de azúcares reductores generados por segundo/mL (nKat/mL). Los ensayos fueron realizados cinco veces.

Determinación de actividad xilanasa (XL)

La cuantificación de los azúcares reductores obtenidos como productos de hidrólisis de la enzima xilanasa sobre el sustrato xilano de madera de abedul, se realizó con el método de Nelson-Somogyi (27, 28). Para la cuantificación se realizó una curva de calibración, usando como patrón xilosa en el rango de 0 - 500 $\mu\text{g/mL}$ (27- 29). Para la medida de actividad de la enzima xilanasa se tomaron 100 μL de extracto enzimático y 250 μL de xilano de madera de abedul 0,5% (p/v) en buffer Borato/HCl 100 mM pH 9,0; dicha mezcla fue incubada a 45 °C por 20 min. La unidad de actividad XL fue definida como nmoles de azúcares reductores generados/mL (nKat/mL). Los ensayos fueron realizados cinco veces.

Estadística

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) empleando un procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con ayuda de la herramienta Statgraphics Centurion.

Resultados y discusión

Selección de la metodología para la extracción del fluido intercelular

Para la extracción del fluido de lavado intercelular (IFW) en raíces de clavel se ensayaron las metodologías propuestas por Van Pelt-Heerschap (19) y Olivieri *et al.* (18). La eficiencia de estas se determinó midiendo la cantidad de proteína extraída. Los resultados (Figura 2) indican que con el tratamiento en el cual se aplica vacío (18) se incrementa la cantidad de proteína extraída. Este método utiliza un buffer que contiene NaCl y β -mercaptoetanol, el cual se infiltra en el tejido al aplicar vacío y así aumenta la extracción de proteína. El efecto del NaCl es de tipo iónico ya que las cargas del compuesto disociado interactúan con los aminoácidos cargados de las proteínas. Esto puede facilitar el proceso de extracción (30) que, acompañado del tratamiento con vacío, favorece la liberación de las proteínas del apoplasto, para luego, al ser centrifugadas, obtener un extracto rico en proteínas (30). El resultado anterior permite afirmar que el tratamiento reportado por Olivieri *et al.* (18), para la extracción del fluido intercelular a partir de tubérculos de papa es el más adecuado para extraer una mayor cantidad de proteínas.

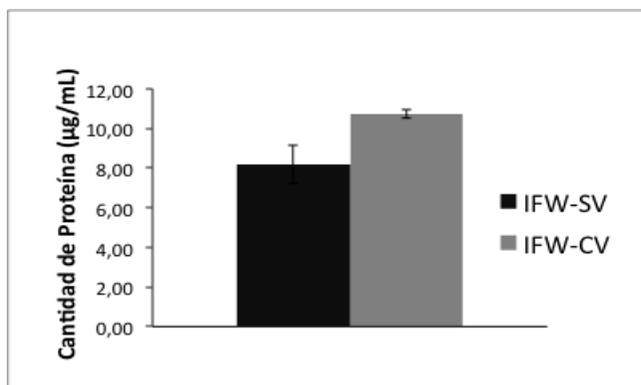


Figura 2. Contenido de proteína presente en el fluido intercelular obtenido en los tratamientos sin vacío (IFW-SV) y con vacío (IFW-CV) n=3.

Seleccionado el método de extracción, se verificó la integridad del material intracelular para determinar que no se hubiera presentado lisis celular; se usó como marcador la enzima α -manosidasa, ubicada en la vacuola. Los resultados (Tabla 1) presentan la mayor actividad de la enzima en el extracto intracelular (EIn), la obtenida en el IFW representa el 0,68% de actividad, valor comparable al obtenido por Olivieri *et al.* (18), quienes reportan actividad α -manosidasa en el IFW de 0,45% respecto al extracto intracelular. Estos resultados demuestran que en el proceso de extracción del fluido intercelular es mínima la ruptura intracelular, que la metodología se realizó de manera adecuada y fue útil para el análisis deseado.

Tabla 1. Actividad α -manosidasa en fluido intercelular (IFW) y extracto intracelular (EIn)

Extracto	Unidades de actividad (nmol/min·mL)
IFW	0,16 \pm 0,1
EIn	23,5 \pm 13

Selección de la metodología para la extracción del contenido intracelular en raíces de clavel

El contenido enzimático celular, se puede evaluar en el tejido total de la raíz (IFW+simplasto) denominado también extracto crudo (EC), o separando primero el IFW y en el tejido sobrante realizar extracción del contenido intracelular (simplasto) (EIn), para así obtener diferentes extractos: el crudo (EC) y el intracelular (EIn) en los cuales se determina el contenido de proteína y la actividad enzimática de las enzimas seleccionadas.

En la Figura 3 se observa que con los tres procedimientos de extracción ensayados es posible obtener cantidades diferenciales de proteína a partir de las raíces. Luego de extraer el IFW, los tratamientos de extracción presentaron un comportamiento similar en el tejido total (EC) y en el tejido sobrante (EIn). La mayor cantidad de proteína se extrajo con los procedimientos que utilizaron buffer fosfatos y buffer fosfatos + PVPP, mientras que con el método que utilizó lavados previos con acetona a las raíces (EIn-AC y EC-AC) se extrajo la menor cantidad.

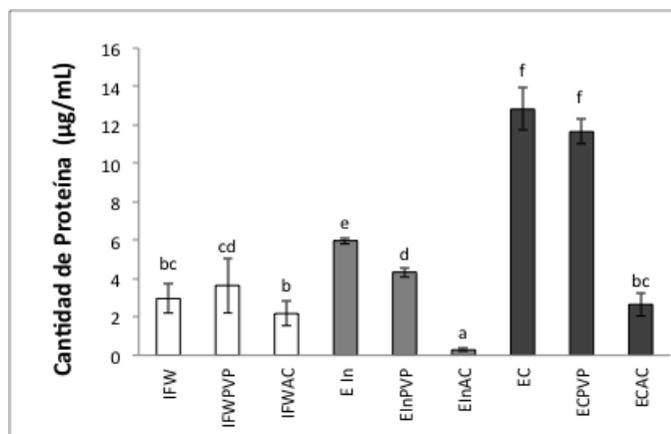


Figura 3. Resultados de la determinación de la cantidad de proteína extraída usando extractos en raíces de plantas. Fluido intercelular (IFW) para obtención posterior de extracto intracelular con buffer fosfato (EIn), fluido intercelular (IFWPVP) para obtención posterior de extracto intracelular con buffer fosfato con polivinilpirrolidona (EInPVP), fluido intercelular (IFWAC) para obtención posterior de extracto intracelular con tratamiento previo usando acetona (EInAC). Extracto crudo tratado con buffer fosfato (EC), extracto crudo tratado con buffer fosfato más polivinilpirrolidona (ECPVP), extracto crudo con tratamiento previo con acetona (ECAC) n=5

El tratamiento con acetona contribuyó a la pérdida de un alto contenido de proteína, probablemente por efecto de desnaturalización. El PVPP tampoco presentó el efecto descrito en la literatura (22, 23). Los resultados presentaron coherencia en cuanto al contenido de proteína, ya que su valor en el EC es aproximadamente la suma del presente en el contenido intercelular y en el extracto intracelular.

La menor cantidad de proteína, estadísticamente significativa, se presenta en el IFW como se esperaba, ya que se aplicó en todos la metodología previamente seleccionada para su obtención. Los valores de proteína presentes en el IFW obtenidos de raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) se aproximan a los reportados en el IFW obtenido en papa de 2 µg/mL (18).

La Figura 4 corresponde a la actividad proteasa (PRT) determinada en los diferentes extractos obtenidos de las raíces de clavel. Se observó actividad tanto en los extractos intracelulares (EIn) que corresponden al simplasto, como en los extractos extracelulares (IFW) correspondientes al apoplasto. En el fluido de lavado intercelular (IFW, IFW-PVPP e IFW-AC), se presentaron diferencias significativas, aunque no entre todos los tratamientos. Cuando se comparan los tres tratamientos de extracción evaluados en el material vegetal sobrante (EIn), luego de extraer el fluido de lavado intercelular, y en el tejido total de las raíces (EC), se observó que la actividad más alta corresponde al extracto obtenido con un tratamiento previo de lavados con acetona (EIn-AC). Este hecho se atribuye a que el tratamiento con acetona puede estabilizar la enzima o permite obtener un extracto más puro de esta, debido a la reducción de agua y de pigmentos de la planta (31-33).

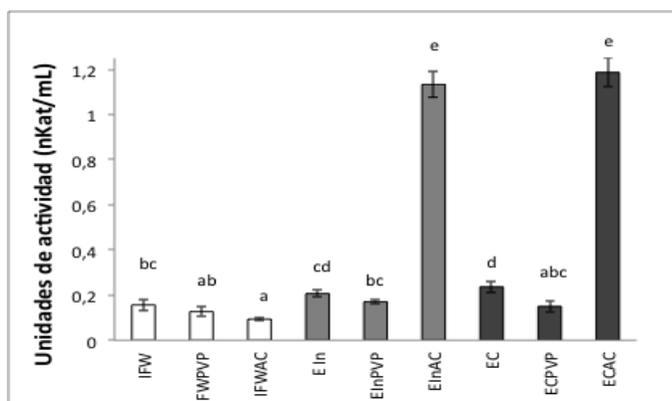


Figura 4. Resultados de la actividad proteasa obtenida usando extractos en raíces de plantas. Fluido intercelular (IFW) para obtención posterior de extracto intracelular con buffer fosfato (EIn), fluido intercelular (IFWPVP) para obtención posterior de extracto intracelular con buffer fosfato con polivinilpirrolidona (EInPVP), fluido intercelular (IFWAC) para obtención posterior de extracto intracelular con tratamiento previo usando acetona (EInAC). Extracto crudo tratado con buffer fosfato (EC), extracto crudo tratado con buffer fosfato más polivinilpirrolidona (ECPVP), extracto crudo con tratamiento previo con acetona (ECAC) n=5

Se encontraron valores similares (Figura 5) en la actividad pectato liasa (PL) en los diferentes extractos, a excepción del extracto crudo tratado previamente con polvos de acetona (EC-AC), en donde la actividad fue estadísticamente mayor, debido a la extracción del contenido total de la célula y a una posible estabilización de la enzima con este tratamiento (32, 33), hecho que no se presenta al realizar el mismo tratamiento al material residual luego de extraer el IFW. De las enzimas analizadas, esta es la única que presenta aumento de actividad por la adición de PVPP al buffer de extracción, aunque, si se compara con el método que usa solamente el buffer, no se presentan grandes diferencias.

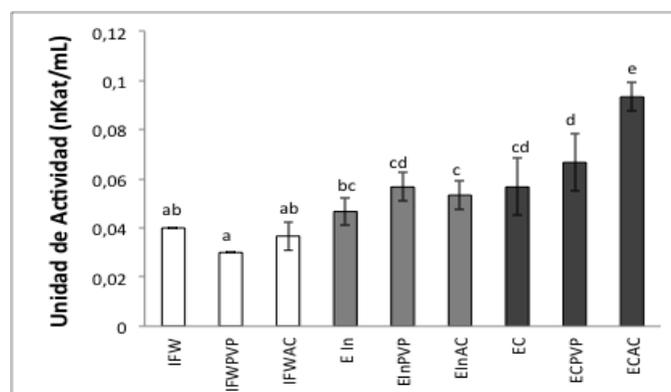


Figura 5. Resultados de la actividad pectato liasa obtenida usando extractos en raíces de plantas. Fluido intercelular (IFW) para obtención posterior de extracto intracelular con buffer fosfato (EIn), fluido intercelular (IFWPVP) para obtención posterior de extracto intracelular con buffer fosfato con polivinilpirrolidona (EInPVP), fluido intercelular (IFWAC) para obtención posterior de extracto intracelular con tratamiento previo usando acetona (EInAC). Extracto crudo tratado con buffer fosfato (EC), extracto crudo tratado con buffer fosfato más polivinilpirrolidona (ECPVP), extracto crudo con tratamiento previo con acetona (ECAC) n=5

La actividad poligalacturonasa (PG) (Figura 6) se observó en todos los extractos trabajados (IFW, EIn y EC). De acuerdo a lo esperado, la actividad en el IFW no presentó mayores diferencias, sus valores son similares a los obtenidos en el extracto intracelular (EIn) y en el extracto total (EC). En la extracción de la enzima PG intracelular (EIn y EC) el tratamiento que mejor funcionó fue el que utilizó buffer fosfatos, mientras que la actividad más baja se presentó en los extractos que fueron tratados previamente con acetona (EIn-AC y EC-AC). Esto podría indicar que con dicho tratamiento no se estabiliza la enzima ni se extrae, más bien podría desnaturalizarla. Los mayores valores de actividad para la enzima se obtuvieron en el EC obtenido con buffer fosfatos, cuando se le adicionó PVPP.

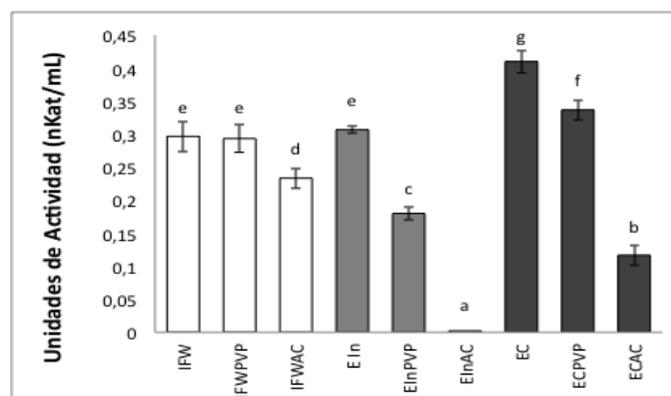


Figura 6. Resultados de la actividad poligalacturonasa obtenida usando extractos en raíces de plantas. Fluido intercelular (IFW) para obtención posterior de extracto intracelular con buffer fosfato (EIn), fluido intercelular (IFWPVP) para obtención posterior de extracto intracelular con buffer fosfato con polivinilpirrolidona (EInPVP), fluido intercelular (IFWAC) para obtención posterior de extracto intracelular con tratamiento previo usando acetona (EInAC). Extracto crudo tratado con buffer fosfato (EC), extracto crudo tratado con buffer fosfato más polivinilpirrolidona (ECPVP), extracto crudo con tratamiento previo con acetona (ECAC) n=5

El uso de acetona y PVPP en el extracto crudo y en el extracto intracelular disminuye la actividad de la enzima (PG). Esto indica que estos tratamientos, comúnmente empleados para eliminar compuestos fenólicos interferentes, no son efectivos pues afectan la estabilidad del extracto y, por lo tanto, la cantidad de enzima.

Para la enzima xilanas (XL) (Figura 7) se presentó un comportamiento similar de los extractantes al observado en el caso de la PG (Figura 6), es decir, los mayores niveles de actividad se presentaron cuando se realizó la extracción con buffer fosfato y los menores cuando se utilizó acetona. Lo que indica que estos tratamientos para eliminar compuestos fenólicos interferentes afectan la estabilidad (23, 33), y por lo tanto la cantidad de enzima o presentan interferencias en el método de detección. La mayor actividad encontrada para la enzima de estudio en el extracto crudo tratado con buffer fosfatos (EC) concuerda aproximadamente, con la suma de las actividades entre el fluido intercelular (IFW) y el extracto intracelular tratado con buffer fosfatos (EIn). Para las muestras tratadas con PVPP y acetona no se observa esta concordancia, lo que indica pérdidas en la extracción a partir del tejido total. Los métodos de extracción empleados para cada tejido presentaron diferencias estadísticas, comportamiento que no había sido observado en las demás enzimas donde la extracción con buffer fosfatos y buffer fosfatos + PVPP presentaron niveles semejantes.

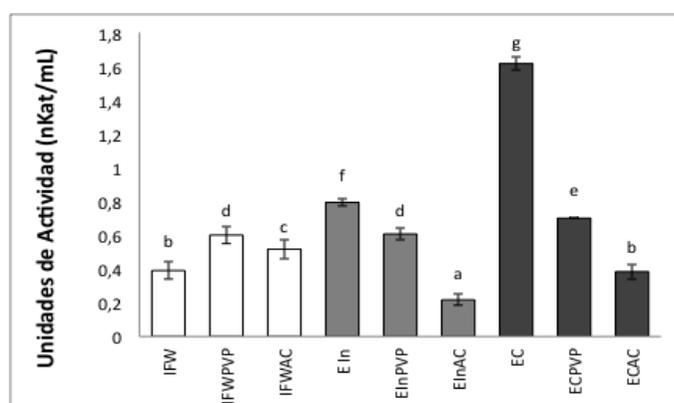


Figura 7. Resultados de la actividad xilanas obtenida usando extractos en raíces de plantas. Fluido intercelular (IFW) para obtención posterior de extracto intracelular con buffer fosfato (EIn), fluido intercelular (IFWPVP) para obtención posterior de extracto intracelular con buffer fosfato con polivinilpirrolidona (EInPVP), fluido intercelular (IFWAC) para obtención posterior de extracto intracelular con tratamiento previo usando acetona (EInAC), Extracto crudo tratado con buffer fosfato (EC), extracto crudo tratado con buffer fosfato más polivinilpirrolidona (ECPVP), extracto crudo con tratamiento previo con acetona (ECAC) n=5.

Los resultados anteriores indican que el tratamiento previo con acetona a las raíces de clavel, si bien favorece la extracción de PRT, en otros casos genera una notable disminución de la actividad. El PVPP disminuye la actividad de las enzimas PG y XL y, en menor grado, para las enzimas PRT y PL si se compara con el tratamiento que usa únicamente buffer fosfato. Sin embargo, esta disminución es menor que cuando se utiliza acetona.

Estos resultados son un aporte para la selección de una metodología de extracción para una enzima específica, a partir de raíces de clavel. Sin embargo, si el interés está dirigido al estudio de las cuatro enzimas simultáneamente, se recomienda el uso del buffer fosfatos como extractante, pues permite la obtención de varias enzimas en un único paso y, así, un análisis comparativo de actividad enzimática.

Es importante destacar que en este estudio se reportan por primera vez los niveles de actividad para las enzimas líticas PRT, PL, PG y XL en raíces clavel, tanto en el apoplasto como en el simplasto.

En el IFW se encuentran diferentes niveles de actividad para las enzimas estudiadas, los mayores son para PG, XL y PRT y el más bajo lo presenta la enzima PL. Estas enzimas están también intracelularmente presentes con niveles que varían de acuerdo al método de extracción. Estos niveles de actividad pueden tener variación cuando un patógeno ingresa a la planta y utiliza estas mismas enzimas en el proceso de colonización (8).

Conclusiones

Con los resultados presentados en el artículo, se determinaron los efectos de diferentes soluciones extractantes en la actividad de las enzimas PG, PL, XL, PRT, presentes en el simplasto de raíces de clavel. Se aconsejó una metodología sencilla y poco contaminante que permite la extracción de las cuatro enzimas estudiadas en un único paso y así determinar comparativamente niveles de actividad. Se seleccionó una metodología para extraer el IFW en el mismo tejido, con mínima contaminación del contenido intracelular. Se determinaron los niveles de las cuatro enzimas en el apoplasto, en el simplasto y en el extracto total de raíces de clavel.

Agradecimientos

Las autoras agradecen a la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, y a la División de Investigación quien apoyó el desarrollo del trabajo, a través del proyecto aprobado con código HERMES 20692.

Referencias

- Regalado, A.P.; Ricardo, P.P. Study of the intercellular fluid of healthy lupinus albus organs. *Plant Physiol.* **1996**, *110*, 227-232.
- Lagaert, S.; Beliën, T.; Volckaert, G. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2009**, *20* (9), 1064-1073. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.05.008>.
- Vorwerk S.; Somerville S.; Somerville C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.* **2004**, *9* (4), 203-209. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2004.02.005>.
- Cantu, D.; Vicente, A.R.; Greve, L.C.; Dewey, F.M.; Bennett, A.B.; Labavitch, J.M.; Powell, A.L.T. The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to Botrytis cinerea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105* (3), 859-864. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0709813105>.
- Mendoza-Rodríguez, M.; Sánchez, R.A.; Leiva, M.M.; Acosta, S.A.; Rojas, L.; Jiménez, E.; Portal, O. Extracción de proteínas a partir del fluido intercelular en hojas de banano, cultivar 'Grande naine' (Musa AAA). *Biotechnol. Veg.* **2006**, *6* (1), 59-62.
- Delaunoy, B.; Jeandet, P.; Clément, C.; Baillieux, F.; Dorey, S.; Cordelier, S. Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. *Front Plant Sci.* **2014**, *5*, 18. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00249>.

7. Reignault, Ph; Valette-Collet, O; Boccara, M The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. *Eur. J. Pathol.* **2008**, *120*, 1-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-007-9184-y>.
8. Ramírez. V. E. Evaluación de los niveles de actividad y transcripcionales in vivo de algunas enzimas hidrolíticas secretadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en su interacción con el clavel *Dianthus caryophyllus* L. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. **2014**.
9. Collmer, A.; Keen, N.T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1986**, *24*, 383-409. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.002123>.
10. Walton, J.D. Deconstructing the Cell Wall'. *Plant Physiol.* **1994**, *104* (4), 1113-1118. DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1104/pp.104.4.1113>.
11. De Lorenzo, G.; Castoria, R.; Bellincampi, D.; Cervone, F. Fungal invasion enzymes and their inhibition. In *The mycota V. Plant relationships*; Carroll C., Tudzynski R. Eds.; Springer Berlin Heidelberg, **1997**; 61-83. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-10370-8_5.
12. Vorwerk, S.; Somerville, S.; Somerville, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.* **2004**, *9* (4), 203-209. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2004.02.005>.
13. Silipo, A.; Erbs, G.; Shinya, T.; Dow, J.M.; Parrilli, M.; Lanzetta, R. et al. Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology* **2010**, *20*, 406-419. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwp201>.
14. Franková, L.; Fry, S.C. Biochemistry and physiological roles of enzymes that 'cut and paste' plant cell-wall polysaccharides. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 3519-3550. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ert201>.
15. Minic, Z.; Jouanin, L. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol. Bioch.* **2006**, *44* (7-9), 435-449. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.08.001>.
16. Oviedo, H.I. Los oligogalacturonidos de origen péctico y su acción en las plantas. *Tema de cienc. y tecnol.* **2009**, *39* (13), 31-40.
17. Hoorn, R.A. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Rev. Plant Pathol.* **2008**, *59*, 191-223. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092835>.
18. Olivieri, F.; Godoy, A.V.; Escande, A.; Casalongué, A.C. Analysis of intercellular washing fluids of potato tubers and detection of increased proteolytic activity upon fungal infection. *Physiol. Plant.* **1998**, *104* (2), 232-238. DOI: <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040211.x>.
19. Van Pelt-Heerschap, H.; Smit-Bakker, O. Analysis of defense-related proteins in stem tissue of carnation inoculated with a virulent and avirulent race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Eur. J. Plant Pathol.* **1999**, *105*, 681-691. DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008767830202>.
20. Zor. T.; Selinger. Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* **1996**, *236* (2), 302-308. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.0171>.
21. Ardila, H.; Higuera, B.L. Inducción diferencial de polifenoloxidasas y β -1,3- glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus*) durante la infección por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. *Acta Biol. Colomb.* **2005**, *10* (2), 61-74.
22. Ardila, H.; Baquero B; Martínez S. Inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) por elicitores del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* raza 2. *Rev. Colomb. Quim.* **2007**, *36* (2), 151-167.
23. Cuervo, D C; Martínez, S T; Ardila, H D; Higuera, B L.. Inducción diferencial de la enzima peroxidasa y su relación con lignificación en los mecanismos de defensa del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante su interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. *Rev. Colomb. Quim.* **2009**, *38* (3) 379-393.
24. Boller, T.; Kende, H. Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiol.* **1979**, *63*, 1123-1132. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.63.6.1123>.
25. Hübner, U.; Bock, U.; Schügerl, K. Production of alkaline serine protease subtilisin Carlsberg by *Bacillus licheniformis* on complex medium in a stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1993**, *40* (2), 182-188.
26. Parra L. F. Estudio de enzimas que participan en la infección Fusarium-Clavel. Purificación y caracterización parcial de poligalacturonasa (EC. 3.2.1.15) y pectato liasa Bibliografía 153 (EC. 4.2.2.2.). Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química, **2001**. pp 26-28.
27. Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **1944**, *153*, 375-380.
28. Somogyi, M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 19-23.
29. Tagawa, K.; Kaji, A. Polygalacturonase from *Corticium rolfsii*. *Methods Enzymol.* **1988**, *161*, 361-366. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)61041-X](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(88)61041-X).
30. Terry, M.E; Bonner. B.B. An examination of centrifugation as a method of extracting an extracellular solution from peas, and its use for the study of indoleacetic acid-induced growth. *Plant Physiol.* **1980**, *66*, 321-325. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.66.2.321>.
31. Adulyatham, P.; Owusu-Apenten, R. Stabilization and partial purification of a protease from ginger rhizome (*Zingiber officinale* Roscoe). *J. Food Sci.* **2005**, *70*, C231-C234. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07130.x>.
32. Takemori, S.; Furuya, E.; Suzuki, H.; Katagiri, M. Stabilization of enzyme activity by an organic solvent. *Nature* **1967**, *215*, 417-419. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/215417a0>.
33. Fishman, A.; Levy, I.; Cogan, U.; Shoseyov, O. Stabilization of horseradish peroxidase in aqueous-organic media by immobilization onto cellulose using a cellulose-binding-domain. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *18*, 121-131.

Article citation:

Ramírez, E.; Martínez, S. T. Determinación del contenido extra e intracelular de algunas enzimas líticas relacionadas con pared celular en raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.). *Rev. Colomb. Quim.* **2016**, *45* (2), 5-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.60370>.



Ana Lucía Paredes-Doig^{1,*}, María del Rosario Sun Kou², Gino Picasso-Escobar¹,
Elizabeth Doig-Camino³, Germán Comina¹

¹Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Ingeniería. Av. Túpac Amaru 210- Lima 25- Perú.

²Sección Química. Departamento de Ciencias. Pontificia Universidad Católica del Perú, Av. Universitaria 1801, Lima 32, Perú.

³Sección Matemáticas. Departamento de Ciencias. Pontificia Universidad Católica del Perú, Av. Universitaria 1801, Lima 32, Perú.

*Autor para correspondencia: anludoig@gmail.com

Recibido: 19 de Mayo de 2016. Aceptado: 15 de Junio de 2016.

Implementación y evaluación de una nariz electrónica para la detección de alcoholes lineales

Resumen

Se desarrolló una nariz electrónica que permite la detección de alcoholes de manera sencilla y económica en comparación con las narices electrónicas tradicionales. Está basada en cuatro sensores de gas de SnO₂ (dos comerciales y dos fabricados en el laboratorio), un sistema neumático irregular, un hardware y software para adquisición de datos y un software de reconocimiento de patrones. Se evaluó el comportamiento de la nariz y las condiciones de trabajo con muestras de vapor de alcoholes (metanol, etanol, n-butanol y 1-2 octanol) y se determinó que los alcoholes se pueden detectar con el arreglo de sensores preparado y pueden diferenciarse entre sí haciendo uso del análisis estadístico de componentes principales (PCA). El orden de detección encontrado para los alcoholes lineales fue el siguiente: metanol > etanol > n-butanol > 1-octanol. Se encontró también que haciendo uso del análisis de componentes principales (PCA) y realizando una normalización de los datos en el software de reconocimiento de patrones, la varianza total de las muestras también aumenta del 76% al 85%. Esto demuestra que una nariz simple y económica puede clasificar bien las muestras evaluadas.

Palabras clave: nariz electrónica, clasificación de alcoholes, arreglo de sensores, PCA, sensores de gas, óxido de estaño.

Implementation and evaluation of an electronic nose for the alcohols detection

Abstract

An electronic nose for the detection of alcohols, easy to use and inexpensive as compared to traditional electronic noses, was developed. This nose is based on four SnO₂ gas sensors (two commercial and two home-made), an irregular pneumatic system, hardware and a software for data acquisition and a software for pattern recognition. The nose behavior and the working conditions with vapor samples of alcohols (methanol, ethanol, n-butanol and 1-octanol) were evaluated. Alcohols could be detected with the array of prepared sensors and could be also differentiated from each other by using principal component analysis (PCA). The detection order for linear alcohols followed the order: methanol > ethanol > n-butanol > 1-octanol. It was also found that by using PCA and performing a standardization of data in software pattern recognition so, the total variance of such information increases from 76% up to 85%. This result confirms that a simple and inexpensive nose can rank well the tested samples.

Keywords: electronic nose, alcohol classification, array of sensors, PCA, gas sensors, tin oxide.

Implementação e avaliação de um nariz eletrônico para detectar álcoois lineares

Resumo

Foi feito um nariz eletrônico que permitiu a detecção de álcoois de jeito simplis e económico em comparacao com os narices eletrónicos tradicionais. Está baseado em quatro sensores de gás SnO₂ (dois comerciais e dois feitos no laboratório), um sistema pneumático irregular, hardware e software para aquisição de dados e software de reconhecimento de padrões. Foi avaliado o comportamento do nariz e as condições de trabalho com amostras de vapor de álcoois (metanol, etanol, n-butanol e 1-octanol) determinou-se que os álcoois podem ser detectados com o arranjo de sensores preparado e pode diferenciar-se entre sim usando análise de componentes principais (PCA). A ordem de detecção para os álcoois lineares encontrados foi os seguinte: metanol > etanol > n-butanol > 1-octanol. Verificou-se que, usando análise de componentes principais (PCA) e a execução de uma normalização dos dados no software de reconhecimento de padrões, a variância das amostras também aumenta de 76% para 85%. Isto demonstra que um nariz simples e barato pode classificar bem as amostras avaliadas.

Palavras-Chave: nariz eletrônico, classificação de álcoois, arranjo de sensores, PCA, sensores de gas, óxido de estanho.

Introducción

Los sensores de gas basados en óxidos semiconductores son dispositivos que presentan un cambio en la resistencia cuando son expuestos a ciertos gases, principalmente los denominados compuestos orgánicos volátiles (VOCs). En estos, la conductividad cambia de acuerdo a los cambios de concentración, debido a la adsorción/desorción de oxígeno y la reacción entre el oxígeno superficial y los gases. Hoy en día, los sensores de gas son muy requeridos debido a su aplicación en diversas áreas como el monitoreo ambiental, la seguridad pública y doméstica, entre otras. Sin embargo, para la aplicación de estos sensores, es necesario encontrar alternativas cada vez más económicas, confiables y que no consuman tanta energía (1).

Entre estos óxidos metálicos semiconductores (MOS) (2-4), se encuentra el óxido de estaño. En los últimos años, los estudios en sensores han mostrado que existen factores que influyen las propiedades sensoras de los óxidos metálicos: el tamaño de grano de las partículas (5, 6), la microestructura del material sensor y la modificación química de la superficie de las partículas, por ejemplo, adicionando metales nobles como el paladio o el platino (7-13).

Los metales nobles (entre ellos el paladio, utilizado en este estudio) contribuyen en dos formas: creando sitios para la adsorción molecular del gas y disminuyendo la energía de activación para la reacción de sensado. En el estudio de sensado de muestras gaseosas, estas son detectadas por un cambio en la resistencia eléctrica del óxido semiconductor. Esta resistencia varía debido a las reacciones que se llevan a cabo en la superficie del sensor con las especies de oxígeno quimioadsorbidas (14).

Ahora bien, una de las aplicaciones de los sensores de gas es la construcción de narices electrónicas. Estas son una simulación del aparato olfativo del ser humano y son dispositivos no destructivos que entregan como resultado de medición una huella digital de los datos detectados (15).

Estos dispositivos empezaron a desarrollarse desde 1980 (2, 3) y hasta la actualidad han contribuido a analizar y diferenciar una variedad de muestras en distintos campos de la ciencia (16). Hasta la fecha se han realizado trabajos de este tipo especialmente en Europa (2, 14), aunque también se conocen investigaciones en América Latina, por ejemplo en Perú (17).

Las narices electrónicas se emplean en el monitoreo del etanol, por ejemplo, en el control de procesos de fermentación, en el control ambiental, en alarmas de escape de gases, en la detección de alcohol en aliento, etc. (18). Sin embargo, usar estas narices electrónicas supone cantidades considerables de sensores para diferenciar las muestras, además de emplear controladores másicos de flujo. La presente investigación tuvo como objetivo probar mediante mediciones repetidas en sistemas dinámico y estático, haciendo uso del Análisis de Componentes Principales (PCA) que una nariz electrónica simple (con solo cuatro sensores y sin controladores másicos de flujo) puede distinguir muestras diferentes de compuestos volátiles.

Materiales y métodos

Sistema dinámico y sistema estático

Con el objetivo de construir una nariz electrónica sin controladores másicos de flujo, se procedió a comparar dos sistemas de medición: estático y dinámico. El método dinámico consiste en registrar las mediciones desde que se empieza a hacer fluir el vapor de la muestra. Por otro lado, para el sistema estático primero se almacena la muestra en una cámara de gas, donde se satura y después se empieza a medir. De este modo, empleando el método estático, se espera que la clasificación de las muestras se incremente significativamente.

Para estudiar la cantidad de datos obtenida se empleó la técnica de análisis multivariado y análisis de componentes principales (PCA), con la finalidad de reducir la dimensionalidad de los datos y obtener una representación gráfica del proceso experimental (19).

Preparación del SnO₂ dopado con Pd

Los óxidos de estaño se prepararon usando el método de impregnación húmeda que consiste en mezclar 2 g de SnO₂ en polvo con 100 mL de una disolución acuosa de PdCl₂ (Sigma Aldrich) a una concentración previamente fijada de Pd y HCl (20). La mezcla se agitó durante 15 min a 30 °C hasta alcanzar el equilibrio térmico y obtener una suspensión sólida. Posteriormente, se adicionaron 20 mL de una solución de SnCl₂ (empleando 0,3793 g) a la misma temperatura y en agitación constante por 50 min. La mezcla se filtró y el sólido resultante se lavó, primero con una solución ácida (HCl 0,005 M), y luego con abundante agua. El secado se realizó a 80 °C durante 24 h y la calcinación a 400 °C durante 1 h. Al final se obtuvo Pd-SnO₂ en polvo al 5% p/p.

Preparación de los sensores

Se combinó Pd-SnO₂ en polvo (0,10 g) con terpineol (32 µL) y etil celulosa (0,02 g) para formar una pasta. Luego, usando el método de impresión llamado screen printing (21-23), se preparó una película gruesa de Pd-SnO₂ sobre un sustrato de alúmina en el que previamente se colocaron electrodos de oro y un calentador de Pt (Figura 1). Los electrodos de oro fueron donados por la Universidad de Oulu de Finlandia y se utilizaron para el debido funcionamiento del sensor, dado que es de tipo electroquímico.

El procedimiento para preparar los sensores constó de los siguientes pasos:

- 1) Se preparó una máscara con cinta adhesiva para definir el área que cubriría la película.
- 2) Se esparció la pasta con una espátula teniendo cuidado de esparcirla uniformemente.
- 3) Se retiró la cinta adhesiva del sustrato.
- 4) Se llevó el sustrato con la película a un horno donde se aplicó un tratamiento térmico a 800 °C por 8 h, con una velocidad de calentamiento de 2 °C/min.

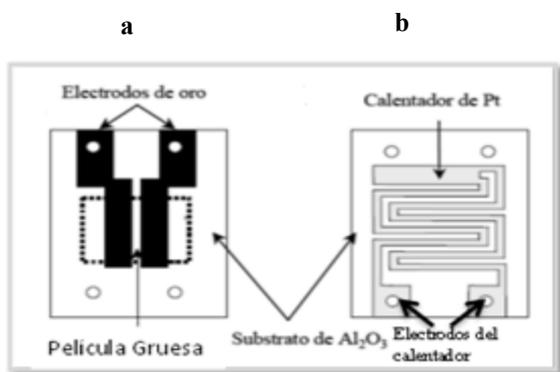


Figura 1. Substrato de alúmina. (a) Cara superior, la cual contiene la película gruesa sobre los electrodos de oro. (b) Cara inferior en que se ubica al calentador de Pt

Construcción de las partes que constituyen la nariz electrónica

Arreglo de sensores

Consiste en un arreglo de cuatro sensores (Tabla 1), todos ellos basados en SnO₂ con diferentes contenidos de Pd (0 y 5%). En el caso de los sensores comerciales, estos se eligieron por tener sensibilidades diferentes: uno al etanol (MQ-3) y el otro al gas licuado de petróleo GLP (MQ-2). Este último se eligió porque se buscó que la nariz no fuera específica a una sola especie química (sensores de gases ideales) sino que respondiera a una amplia gama de olores, constituyéndose en un sistema de reconocimiento del patrón apropiado. De modo que la información de reconocimiento de la calidad del olor está asegurada por todo el patrón de respuestas a través de la matriz de sensores en lugar de la respuesta de un solo sensor en particular (24).

Tabla 1. Sensores usados para conformar la nariz electrónica

Sensor	Material	Lugar de elaboración
S1	Pd-SnO ₂ (5% p/p de Pd)	Laboratorio de investigación en Físico-química de la PUCP
S2	SnO ₂ (0% p/p de Pd)	Laboratorio de investigación en Físico-química de la PUCP
MQ-2	SnO ₂ sensibilidad al GLP	Zhengzhou Winsen Electronics Technology Co., Ltd
MQ-3	SnO ₂ Sensibilidad al etanol	Zhengzhou Winsen Electronics Technology Co., Ltd

Los sensores fueron ubicados en forma circular respecto a las tomas de entrada y de salida de la cámara de gas, como se muestra en la Figura 2. El volumen de la cámara era de 788 cm³ y poseía una tapa hermética de rosca, la cual se retiraba para instalar los sensores y permanecía puesta durante las mediciones.

Para los sensores preparados en el laboratorio, se alimentó el calentador con un voltaje $V_H = 6\text{ V}$ que permite que la película esté a la temperatura de trabajo. Se conectaron los electrodos sobre los que se depositó la película de SnO₂ al circuito de carga tal como se muestra en la Figura 3.

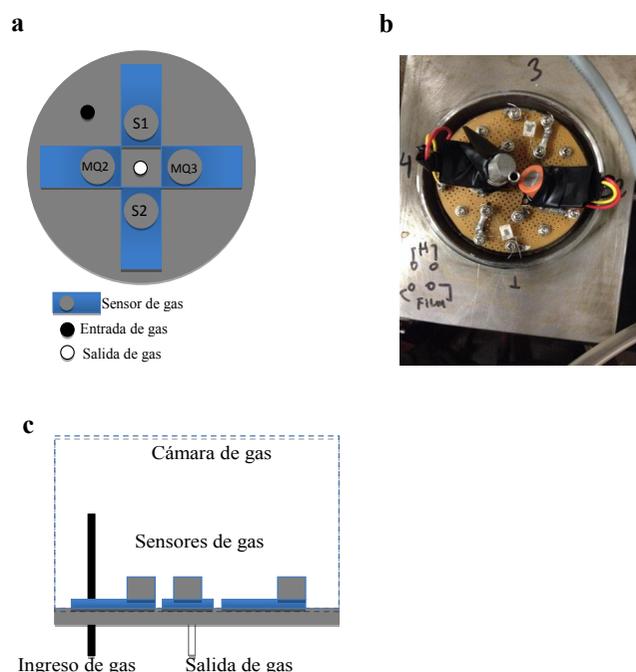


Figura 2. a. Esquema de la distribución geométrica del arreglo de sensores de gas de la nariz electrónica **b.** Imagen de la cámara de gas mostrando los sensores **c.** Esquema donde se indica el ingreso y salida del gas respecto al arreglo de sensores

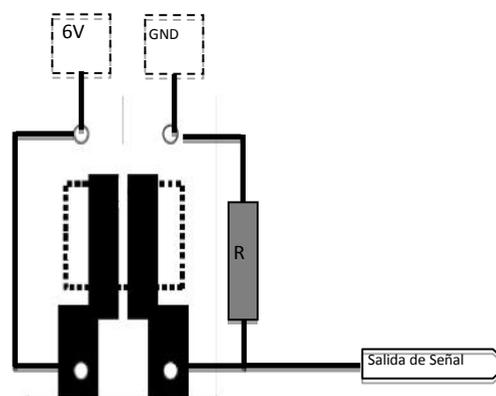


Figura 3. Circuito de carga para los sensores preparados en el laboratorio

La corriente consumida por todos los sensores fue de 0,9 A. La salida de la señal de cada sensor fue conectada a las entradas analógicas de la tarjeta de adquisición (National Instruments (USB 6213)), para obtener las señales a través del sistema de adquisición de datos (software LabviewTM).

Sistema hidráulico

Está conformado por tres válvulas de paso de dos vías (V1, V2, V3) con un solenoide de 24 V y una mini-bomba de vacío (B1) de 24 V. Las válvulas V1 y V2 se conectan a la cámara y la válvula V3 a la bomba B1 como se muestra en la Figura 4.

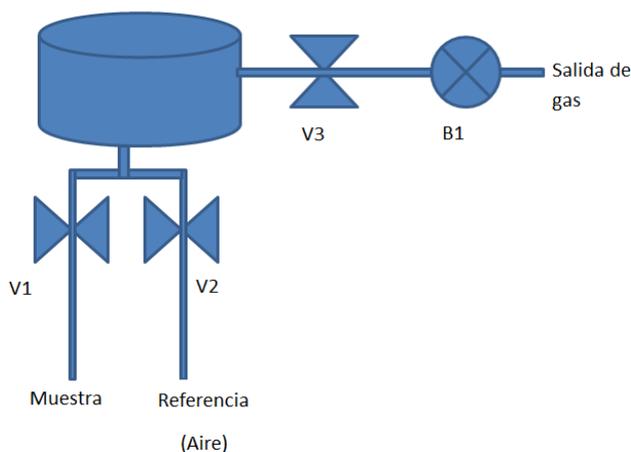


Figura 4. Esquema del sistema hidráulico

Los terminales de cada válvula y los de la bomba se conectan a la salida digital de la tarjeta de adquisición a través de un circuito de potencia, a fin de poder abrir y cerrar las válvulas y activar la bomba usando un sistema para la adquisición y control de datos.

Sistema de adquisición y control de datos

La parte principal de este sistema es la tarjeta de adquisición de datos marca National Instruments (USB 6213), la cual posee un conversor analógico digital (ADC) con una resolución de 16 bits. Adicionalmente, se desarrollaron circuitos de potencia para poder controlar las válvulas de paso y la bomba de vacío. La salida digital de la tarjeta se conectó a la entrada del sistema de potencia, de manera que a través del software se podía controlar la apertura o cierre de las válvulas por las cuales pasaba la muestra en fase gas y el gas de referencia (aire); también se podía controlar el tiempo de encendido y apagado de la bomba.

El programa de adquisición y control de datos fue desarrollado en el lenguaje de programación LabVIEW 2010. El panel de control del programa desarrollado se muestra en la Figura 5.

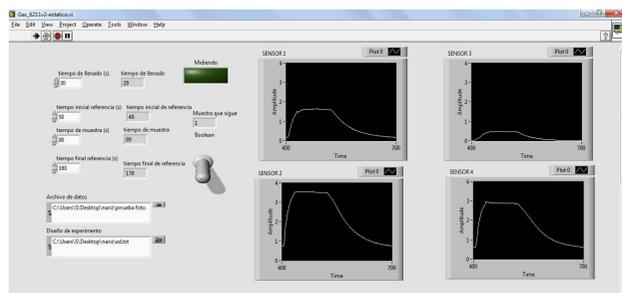


Figura 5. Panel de control de los cuatro sensores

En el panel de control se configuraron los siguientes parámetros: Tiempo inicial de referencia, Tiempo de llenado, Tiempo de análisis de la muestra, Tiempo final de referencia, Archivo de datos, Diseño de experimentos, Midiendo, Muestra siguiente, Interruptor (Boolean).

Procedimiento de calibración y medición

Antes de iniciar la medición de las muestras, se realizó un procedimiento de calibración para determinar los tiempos óptimos requeridos en el programa.

Procedimiento de calibración

Se seleccionó un volumen de muestra entre 20 y 40 mL que fue depositado en una trampa líquida a temperatura ambiente. Luego se conectó la trampa líquida a la entrada de la válvula V1; la válvula V2 siempre se mantuvo conectada a una entrada de aire.

Se determinaron para los cuatro sensores a la vez, el Tiempo inicial de referencia, Tiempo de llenado, Tiempo de análisis de la muestra y Tiempo final de referencia, en ese orden.

Procedimiento de medición

La forma de medición implica exponer al arreglo de sensores a los vapores de las muestras. Este arreglo de sensores se puso dentro de la cámara de gas, la cual posee una entrada y una salida. Previo a la medición, se dejó pasar un flujo de aire a través del sistema y el valor que se obtuvo en los sensores definió el valor base de la señal. Luego, con la bomba, se extrajo el aire saturado con el vapor de la muestra durante el Tiempo de llenado. En este instante la señal de los sensores incrementó su valor. Posteriormente, se cerró la entrada y la salida de la cámara, y se midió la señal de los sensores durante el tiempo de muestra. Posteriormente se abrieron las válvulas de entrada y la salida y se introdujo un flujo de aire por un determinado tiempo, o Tiempo final de referencia, con el objetivo de purgar la cámara. La señal que se obtiene se muestra en la Figura 6.

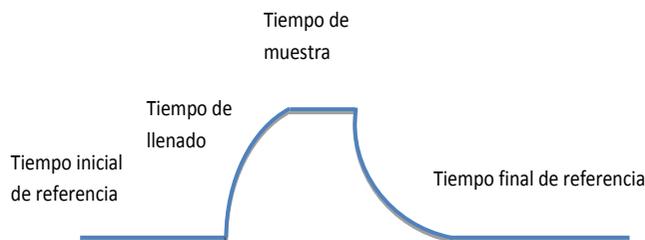


Figura 6. Esquema de los tiempos requeridos para el sensado

Se registran mediciones de vapor de alcohol en un determinado tiempo t en función del cambio de la resistividad del sensor. Estas mediciones se representaron por medio de vectores, denominados r_k , que se definen de la siguiente manera: $r = (m_1, m_2, \dots, m_t)$. Estos vectores muestran las mediciones correspondientes al sensor s (se emplearon cuatro sensores) en el ensayo k (se realizaron 5 ensayos).

Luego, se construye la matriz $M_{k,t,s} = [[W_k]_{t,j}]_{t \times s}$ que corresponde a las mediciones realizadas en el k-ésimo ensayo durante el tiempo t y con los cuatro sensores. De este modo, cada entrada indica la medición registrada por el j-ésimo sensor en el tiempo i (con $i < t$). Las variables que se usaron en el reconocimiento de patrones por el PCA son las mediciones obtenidas por el sensor j en el tiempo i. Finalmente, se utilizó el PCA para clasificar de forma analítica los alcoholes.

Software para el tratamiento de datos

Se desarrolló un software en Matlab para conformar la matriz de objetos y variables necesarias para el análisis PCA. Se usaron los programas Scirius[®], Matlab[®] y Origin[®] para evaluar los resultados.

Resultados y discusión

Evaluación de la nariz electrónica

Sistema Dinámico versus Estático

Usando el sistema de detección dinámico, y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se obtuvo el PCA que se muestra en la Figura 7. Allí se observa que para una misma muestra, en donde m_{ij} representa a las mediciones del j-ésimo ensayo para la muestra i, de todas las mediciones (m_{12} , m_{13} , m_{14}) dos correlaciones son positivas y una es negativa. En cambio en la Figura 8, donde se muestra el PCA de un sistema estático para una misma muestra, o todas las mediciones son positivas, o todas son negativas, o todas están alrededor del cero.

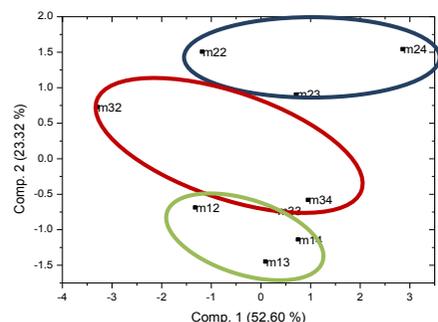


Figura 7. PCA de tres muestras con contenido alcohólico haciendo uso del sistema dinámico

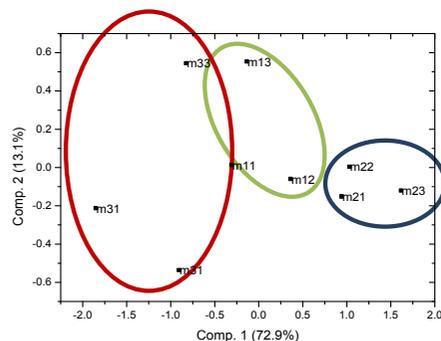


Figura 8. PCA de tres muestras con contenido alcohólico haciendo uso del sistema estático

Esto permitió concluir que el mejor sistema era el estático, por diferenciar mejor las muestras y presentar una varianza de mayor magnitud. Por esta razón, todas las pruebas siguientes se realizaron con dicho sistema. En estudios anteriores también se ha llegado a esta conclusión (25), en donde se demuestra que con el sistema estático se logran distinguir componentes orgánicos volátiles que se encuentran en menores concentraciones (del rango de ppm).

Por lo anterior, se puede observar claramente que los alcoholes se diferencian mejor en un sistema estático. La varianza total para un sistema estático fue mayor, alcanzando el 86 %, mientras que con el sistema dinámico se alcanzó el 75,92% de la varianza. Este resultado es coherente, porque en un sistema estático se tiene una concentración fija de alcohol, lo que permite tener una respuesta más uniforme del sensor.

Detección de alcoholes

Se procedió a comparar la sensibilidad de los cuatro sensores a la detección de los cuatro alcoholes a una concentración del 100% logrando obtener el siguiente orden: metanol > etanol > n-butanol > 1-octanol.

Utilizando los resultados obtenidos con este último arreglo de sensores, se realizó un PCA a las medidas de detección de los alcoholes puros para poder establecer una diferenciación en los alcoholes. Para ello se consideraron la Componente 1 (73,2 %), la Componente 2 (12,8 %) y la Componente 3 (8,2 %).

Los alcoholes estudiados tienen una estructura similar, se diferencian en el tamaño de la cadena. Sin embargo, esta particularidad hace que algunos difundan más rápido que los otros hasta la superficie del óxido semiconductor, por lo que con un análisis multivariado de datos se les puede diferenciar. Se escogió para el análisis del PCA la Primera y Tercera componente, dado que ambas sumaban la mayor varianza total para un PCA bidimensional.

En la Figura 9 se han agrupado los valores obtenidos para cada alcohol, obteniéndose un arrastre vertical para el etanol y n-butanol y una dispersión diagonal para el metanol y el octanol. Otra característica de esta distribución de los alcoholes es que en el PCA aparecen en el orden de longitud de la cadena del alcohol. El de cadena más corta (metanol) aparece a la derecha y el de cadena más larga (1-octanol), a la izquierda. La varianza total fue de 81,4%. Esto significa que hay una buena diferenciación de los alcoholes y que el orden de detección de los alcoholes se da de derecha a izquierda.

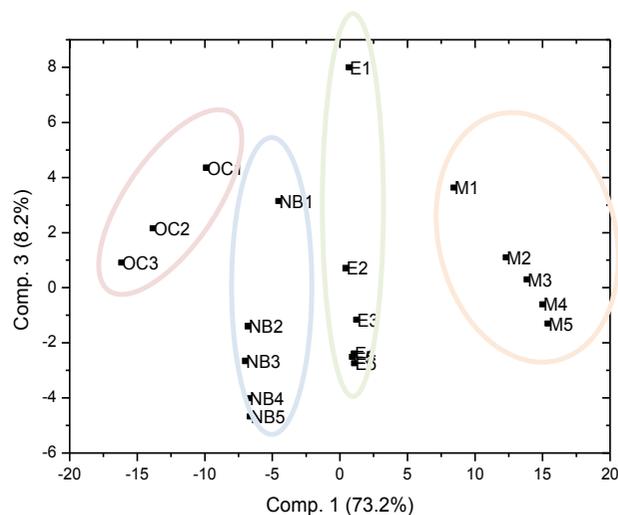


Figura 9. PCA de los alcoholes puros

Usando el programa Scirius[®] se estableció que las correlaciones para el metanol y el etanol son positivas, por lo que se puede interpretar que la detección o sensibilidad es alta para estas moléculas, identificando que una correlación positiva se reconoce por una señal eléctrica que presenta un voltaje más elevado. En cambio, para el n-butanol y el 1-octanol, son correlaciones negativas, Esto indicaría que la sensibilidad disminuye o la detección empeora con estos alcoholes.

Además de la detección y clasificación de alcoholes, se realizaron pruebas de detección de los alcoholes a diferentes concentraciones a una temperatura de 200 °C (la temperatura fue seleccionada en estudios anteriores) (26). Se obtuvieron curvas que permitieron observar el aumento de voltaje medido, al incrementarse la concentración del alcohol hasta cierto punto. El comportamiento de los alcoholes a concentraciones elevadas era prácticamente el mismo, por lo que en la curva se evidenció una meseta. No se logró superar la sensibilidad de los sensores comerciales con los sensores preparados en el laboratorio. Sin embargo, los sensores comerciales tendían a saturarse y a tener un límite en la detección, mientras que los fabricados en el laboratorio seguían aumentando su detección a altas concentraciones (por ejemplo, concentraciones mayores a 500 ppm).

Se determinó otro resultado importante diluyendo las muestras para ver si la nariz detectaba mejor y no se saturaba como las narices electrónicas comunes. Se encontró que la nariz preparada en el laboratorio no requería preparación de las muestras, es decir, no era necesario diluir antes de medir para obtener mejores resultados. Por tanto, se considera que esta nariz podría ser aplicada a procesos industriales, durante o después de la producción, sin necesidad de hacer modificaciones en las muestras.

En la Figura 10, para el etanol por ejemplo, se puede observar una interacción relativamente fuerte entre especie adsorbida-sensor a bajas concentraciones. La interacción química se produce cuando las moléculas a adsorberse (alcoholes) reaccionan con las especies oxigenadas presentes. Esto libera electrones hacia la superficie, disminuyendo la resistencia del sensor (La barrera de Schottky) y aumentando la sensibilidad del mismo (1).

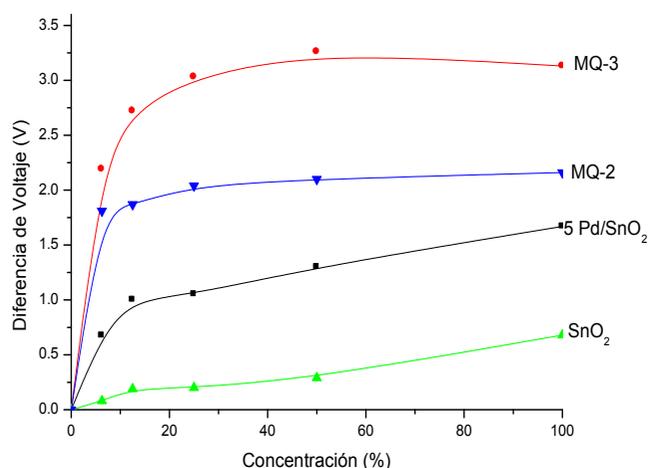


Figura 10. Curvas de detección de etanol a aproximadamente 200 °C (Temperatura del calentador)

También se observa en la Figura 10 que el sensor preparado en el laboratorio con agente dopante (paladio) muestra una sensibilidad más elevada al etanol que el sensor sin dopar. Entonces, se puede notar una mejora en la detección de los alcoholes cuando se incorpora al óxido de estaño una cantidad de metal noble. Este metal noble aumenta el número de sitios activos y disminuye la energía de activación del proceso de adsorción de los alcoholes debido a su carácter de catalizador (1).

Conclusiones

Los sensores de gas preparados en el laboratorio, basados en óxidos de estaño, uno sin dopar y el otro dopado con paladio al 5 % *p/p*, presentaron una buena detección en contacto con alcoholes lineales en el siguiente orden: metanol > etanol > n-butanol > 1-octanol. La variación de voltaje (la señal medida) se incrementa con el aumento en la concentración del vapor de alcohol. Además, estos sensores preparados en el laboratorio no tienden a saturarse a altas concentraciones de alcohol por lo que no se requiere la dilución de las muestras para realizar las mediciones.

Por otro lado, se construyó una nariz electrónica sin controladores máscicos de flujo y de solo cuatro sensores, capaz de detectar y diferenciar alcoholes lineales. Se encontró que el sistema de medida más apropiado para dicha nariz fue el estático. Esta nariz podría emplearse para diferentes fines como el monitoreo de alcohol en aliento o el contenido de alcohol en licores.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Ciencia Activa-CONCYTEC (Proyecto 159-2015), a la Pontificia Universidad Católica del Perú, y a la Universidad Nacional de Ingeniería por el soporte financiero para el desarrollo de esta investigación.

Referencias

- Choudhary, M.; Mishra, V.N.; Dwivedi, R.. Pd-Doped Tin-Oxide-Based Thick-Film Sensor Array for Detection of H₂, CH₄ and CO. *J. Electron. Mater.* **2013**, *42* (9), 2793-2802. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11664-013-2663-3>.
- Ragazzo-Sanchez, J.A.; Chalier, P.; Ghommidh, C. Coupling gas chromatography and electronic nose for dehydration and desalcoholization of alcoholized beverages. Application to off-flavour detection in wine. *Sens. Actuators, B* **2005**, *106*, 253-257. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2004.08.006>.
- Persaud, K.; Dodd, G.H. Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose. *Nature* **1982**, *299*, 352-355. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/299352a0>.
- Papadopoulos, C.A.; Vlachos, D.; Avaritsiotis, J.N. Comparative study of various metal-oxide based gas-sensor architectures. *Sens. Actuators, B* **1996**, *32*, 61-69. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0925-4005\(96\)80110-9](http://dx.doi.org/10.1016/0925-4005(96)80110-9).
- Xu, C.; Tamaki, J.; Miura, N.; Yamazoe, N. Grain size effects on gas sensitivity of porous SnO₂-based elements. *Sens. Actuators, B* **1991**, *3* (2), 147-155. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0925-4005\(91\)80207-z](http://dx.doi.org/10.1016/0925-4005(91)80207-z).

6. Yoshida, K.; Shimano, K.; Yamazoe, N. *Preparation of SnO₂ cluster by hydrothermal treatment for highly sensitive thin film sensor*. Proceedings of the Technical Digest of the 6th East Asian Conference on Chemical Sensor, November 6-9, **2005**, pp. 515-516. Guilin, China.
7. Yamazoe, N.; Kurokawa, Y.; Seiyama, T. Effects of additives on semiconductor gas sensors. *Sens. Actuators* **1983**, *4*, 283-289. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0250-6874\(83\)85034-3](http://dx.doi.org/10.1016/0250-6874(83)85034-3).
8. Matsushima, S.; Maekawa, T.; Tamaki, J.; Miura, N.; Yamazoe, N. Role of additives on alcohol sensing by semiconductor gas sensor. *Chem. Lett.* **1989**, *5*, 845-848. DOI: <http://dx.doi.org/10.1246/cl.1989.845>.
9. Maekawa, T.; Tamaki, J.; Miura, N.; Yamazoe, N. Sensing behavior of CuO loaded SnO₂ element for H₂S detection. *Chem. Lett.* **1991**, *4*, 575-578. DOI: <http://dx.doi.org/10.1246/cl.1991.575>.
10. Duh, J.G.; Jou, J.W. Catalytic and gas sensing characteristics in Pd-doped SnO₂. *J. Electrochem. Soc.* **1989**, *136*, 2740-2747. DOI: <http://dx.doi.org/10.1149/1.2097581>.
11. Kappler, J.; Barsan, N.; Weimar, U.; Dieguez, A.; Alay, J.L.; Romano-Rodriguez, A. *et al.* Correlation between XPS, Raman and TEM measurements and the gas sensitivity of Pt and Pd doped SnO₂ based gas sensors. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1998**, *361*, 110-114. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s002160050844>.
12. Cha, K.H.; Park, H.C.; Kim, K.H. Effect of palladium doping and film thickness on the H₂ gas sensing characteristics of SnO₂. *Sens. Actuators B* **1994**, *21*, 91-96. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0925-4005\(94\)80009-x](http://dx.doi.org/10.1016/0925-4005(94)80009-x).
13. Bagal, L.K.; Patil, J.Y.; Mulla, I.S.; Suryavanshi, S.S. Influence of Pd-loading on gas sensing characteristics of SnO₂ thick films. *Ceram. Int.* **2012**, *38* (6), 4835-4844. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.02.073>.
14. Russo, M.; Serra, D.; Suraci, F.; Di Snzo, R. Fuda, S.; Postorino, S. The potential of e-nose aroma profiling for identifying the geographical origin of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) roots. *Food Chem.* **2014**, *165*, 467-474. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.142>.
15. Qiu, S.; Gao, L.; Wang, J. Classification and regression of ELM, LVQ and SVM for E-nose data of strawberry juice. *J. Food Eng.* **2015**, *144*, 77-85. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.07.015>.
16. Loutfi, A.; Coradeschi, S.; Mani, G. K.; Shankar, P.; Rayappan, J. B. B. Electronic noses for food quality: A review. *J. Food Eng.* **2015**, *144*, 103-111. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.07.019>.
17. Calzado, J.; Comina, G.; Solís, J. Desarrollo de un sistema integrado de sensores para la caracterización organoléptica de pisco. *Revista de Investigación de Física* **2010**, *13*, 2010.
18. Quiñones, J.; NG, Y.; Zambrano, A. Películas gruesas de La₁₋₁₉xSrxFeO₃ como sensores de etanol, *RLMM* **2007**, *27* (1) 52-58.
19. Hong, X.; Wang, J.; Qi, G. E-nose combined with chemometrics to trace tomato-juice quality. *J. Food Eng.* **2015**, *149*, 38-43. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.003>.
20. Delgado, R. D. Sensores de gases basados en óxidos de estaño: una aproximación electroquímica. **2002**. <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2743/Tol1226.pdf?sequence=6>. (fecha de acceso 21.Mayo, 2016).
21. Cadahía, E.; Muñoz, L.; Fernández de Simón, B.; García-Vallejo, C. Changes in low molecular weight phenolic compounds in Spanish, French, and American oak Woods during natural seasoning and toasting. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1790-1798. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf0006168>.
22. Chatonnet, P.; Boidron, J.N.; Pons, M. Maturation of red wines in oak barrels: evolution of some volatile compounds and their aromatic impact. *Sci. Aliments* **1990**, *10*, 565-587.
23. Garde-Cerdán, T.; Rodríguez-Mozaz, S.; Ancín-Azpilicueta, C. Volatile composition of aged wine in used barrels of French oak and of American oak. *Food Res. Int.* **2002**, *35*, 603-610. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00151-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00151-X).
24. Korotcenkov, G. Metal oxides for solid-state gas sensors: what determines our choice. *J. Mater. Sci. Eng. B* **2007**, *139*, 1-23.
25. García, M.; Aleixandre, M.; Gutiérrez, J.; Horrillo, M.C. Electronic nose for wine discrimination. *Sens. Actuators B* **2006**, *113*, 911-916. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2005.03.078>.
26. Paredes-Doig, A.L.; Sun-Kou, M.R.; Comina, G. Alcohols detection based on Pd-doped SnO₂ sensors. En *Sensors (IBERSENSOR), 2014 IEEE 9th Ibero-American*, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, 2014, 1-3.

Article citation:

Paredes-Doig, A. L.; Sun-Kou, M. R.; Picasso-Escobar, G.; Doig-Camino, E.; Comina, G. Implementación y evaluación de una nariz electrónica para la detección de alcoholes lineales. *Rev. Colomb. Quim.* **2016**, *45* (2), 12-18. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.60393>.



Carlos Doria Argumedo^{1,2,*}, Juan Fagundo Castillo²

¹Facultad de Ingeniería, Universidad de La Guajira, Colombia

²Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba

*Autor para correspondencia: cdoria@uniguajira.edu.co

Recibido: 13 de Abril de 2016. Aceptado: 11 de Junio de 2016.

Caracterización química de material particulado PM₁₀ en la atmósfera de La Guajira, Colombia

Resumen

Durante el año 2013, se realizó un estudio en La Guajira, Colombia, con el fin de determinar la fracción respirable y la fracción acuosa del material particulado PM₁₀, producto de las actividades mineras de carbón a cielo abierto que ocupan casi 30% del territorio; también se evaluó su asociación a fuentes naturales y antropogénicas. La recolección de filtros se realizó por medio de un sistema de monitoreo conformado por catorce estaciones mediante equipos muestreadores de alto volumen PM₁₀ (Thermo Scientific VFC-PM10 High Volume Air Sampler). Para el análisis, los filtros de cuarzo fueron sometidos a extracción acuosa en caliente y se determinaron los iones por espectrofotometría UV-VIS. Las concentraciones más altas corresponden a la especie SO₄²⁻ (0,25 µg/m³), Cl⁻ (0,19 µg/m³), NH₄⁺ (0,032 µg/m³), Na⁺ (1,98 µg/m³), Ca²⁺ (0,40 µg/m³) y Mg²⁺ (0,31 µg/m³). Los resultados indican que las principales fuentes responsables del material particulado corresponden al aerosol marino impulsado por las corrientes (Cl⁻ y Na⁺) de origen natural, y las actividades agrícolas, pecuarias (NH₄⁺) y mineras (SO₄²⁻, Ca²⁺ y Mg²⁺) de origen antropogénico.

Palabras clave: material particulado PM₁₀, composición química, iones solubles, actividades mineras, La Guajira.

Chemical characterization of particulated atmospheric matter PM₁₀ in Guajira, Colombia

Abstract

During 2013, a study in La Guajira, Colombia, was conducted to characterize both aqueous and respirable fractions of particulate matter PM₁₀, result of coal mining activities that occupy nearly 30% of the territory, and to evaluate its association with natural and anthropogenic sources. Filters collection was carried out through a monitoring system that consists in fourteen stations, using a high volume sampling equipment PM₁₀ (Thermo Scientific VFC-PM10 High Volume Air Sampler). The extraction was done with hot water and the analysis by UV-VIS spectrophotometry. The highest concentrations correspond to SO₄²⁻ (0.25 µg/m³), Cl⁻ (0.19 µg/m³), NH₄⁺ (0.032 µg/m³), Na⁺ (1.98 µg/m³), Ca²⁺ (0.40 µg/m³) and Mg²⁺ (0.31 µg/m³). Results indicate that the main responsible sources of the chemical content in particulate matter correspond to marine aerosol, impulsed by sea currents (Cl⁻ and Na⁺) from natural origin, and agricultural activities, livestock (NH₄⁺) and mining (SO₄²⁻, Ca²⁺ and Mg²⁺) from anthropogenic origin.

Keywords: Particulate material PM₁₀, chemical composition, soluble ions, mining activities, La Guajira.

Caracterização química do material particulado PM₁₀ na atmosfera da Guajira, Colombia

Resumo

Foi realizado um estudo no ano 2013 na Guajira, Colômbia, com fim de determinar a fração respirável e a fração aquosa do material particulado PM₁₀ produto da mineração de carvão a céu aberto que ocupa quase 30% do território; também foi avaliada sua associação com fontes naturais e antropogênicas. A coleta de filtros foi realizada por um sistema de monitorização composta por quatorze estações utilizando equipamento de amostragem de alto volume de PM₁₀ (Thermo Scientific VFC-PM10 High Volume Air Sampler). Para a análise, os filtros de quartzo foram submetidas à extração aquosa a quente e foram determinados os íons por espectrofotometria UV-VIS. As concentrações mais elevadas correspondem às espécies SO₄²⁻ (0,25 µg/m³), Cl⁻ (0,19 µg/m³), NH₄⁺ (0,032 µg/m³), Na⁺ (1,98 µg/m³), Ca²⁺ (0,40 µg/m³) e Mg²⁺ (0,31 µg/m³). Os resultados indicam que as principais fontes responsáveis do material particulado de origem natural correspondem ao aerossol marinho conduzido pelas correntes oceânicas (Cl⁻ e Na⁺), as atividades agrícolas, pecuárias (NH₄⁺) e mineiras (SO₄²⁻, Ca²⁺ e Mg²⁺) de origem antropogénica.

Palavras-Chave: material particulado PM₁₀, composição química, iones solúveis, actividades mineração, La Guajira.

Introducción

La región de La Guajira, al norte de Colombia, atraviesa un importante desarrollo económico, industrial y minero, que trae como consecuencia el aumento de la contaminación, deteriorando la calidad del aire. Esta zona del país cuenta con un clima desértico y condiciones meteorológicas que contribuyen a la acumulación de material particulado (MP) (1). En estas condiciones, las partículas atmosféricas constituyen uno de los problemas de contaminación más frecuente, al no existir mecanismos naturales para mantener la humedad en los suelos y para lavar la atmósfera. Las partículas atmosféricas son componentes importantes de la atmósfera, pues intervienen activamente en la química y en la física de la atmósfera, especialmente en los procesos de formación de nubes y en el balance radioactivo (2).

En cuanto a su tamaño, las partículas menores a $10\ \mu\text{m}$ o PM_{10} son partículas sólidas o líquidas dispersas en la atmósfera. La mayoría de los estudios de especiación química del material particulado muestran una dependencia entre composición química y tamaño de las partículas. Así, sulfato, amonio, ión hidrógeno, carbón elemental, componentes orgánicos secundarios, especies orgánicas primarias de quemaduras y combustión y ciertos metales de transición son predominantes en la fracción fina del material particulado (3).

En relación a su composición, los principales componentes del material particulado son: sulfato, nitrato, amonio, ión hidrógeno, agua adherida a las partículas, carbono elemental, una gran variedad de compuestos orgánicos y elementos de la corteza terrestre (3). Del mismo modo, incluye elementos livianos como el aluminio, silicio, potasio, calcio, y otros pesados como hierro, zinc, vanadio, titanio, cadmio, plomo, mercurio y antimonio; además compuestos orgánicos de elevada toxicidad y potencial efecto cancerígeno y mutagénico (4).

El conocimiento de la composición química de las partículas que se encuentran en el aire es importante desde el punto de vista epidemiológico y técnico, ya que permite por un lado, determinar el potencial efecto en la salud humana por la presencia de sustancias tóxicas y cancerígenas adheridas a este material y por otro, valorar el aporte de las fuentes de emisión a la contaminación del aire (5).

Sin embargo, los estudios que se han realizado sobre la calidad del aire de La Guajira han considerado solo la concentración en masa del material particulado, pero no se ha tenido en cuenta la composición química. El presente estudio se centró en la caracterización del contenido químico de las partículas PM_{10} de La Guajira, considerando que la deposición seca de importantes especies (NO_3^- , NH_4^+ , K^+ y PO_4^{3-} entre otros) es función de las concentraciones atmosféricas. Estas determinaciones permiten evaluar la entrada de estas sustancias al sistema suelo-vegetación, donde se consideran también los nutrientes (6). De igual modo, el estudio buscó evaluar la relación entre la composición química de las partículas con las actividades naturales y antropogénicas que caracterizan a esta región del país.

Ahora bien, en La Guajira la dispersión de las partículas suspendidas y su disolución en la atmósfera está condicionada por los factores climáticos característicos de una zona insular que presenta temperatura promedio de $29,3\ ^\circ\text{C}$ (con intervalo $22,5\text{--}34,7\ ^\circ\text{C}$), humedad relativa de $70,5\%$ (con intervalo $34\text{--}90\%$), velocidad del viento de $6,8\ \text{km/h}$ (con intervalo de $0,4\text{--}10,9\ \text{km/h}$) en las direcciones principalmente oeste-noroeste y noroeste y promedio de lluvia de $2,4\ \text{mm}$ (con intervalo de $0,25\text{--}38,10\ \text{mm}$) (7).

La humedad en la atmósfera origina un problema de dispersión de la luz, reduciendo la visibilidad. Asimismo, cuando la humedad relativa excede el 70% , muchos tipos de partículas presentan un cambio de fase y se convierten en gotas de niebla, lo cual también disminuye la visibilidad (8) y favorece la aparición de contaminantes secundarios peligrosos, tales como las sustancias responsables de la lluvia ácida.

La fracción de compuestos solubles en agua de las partículas suspendidas en la atmósfera contiene la mayoría de las especies biogeoquímicamente activas, cuya evaluación constituye un aporte importante al estudio de los ciclos de los nutrientes en una región determinada (9).

Como anteriormente se dijo, el estudio se realizó debido a la necesidad de una evaluación de la calidad del aire de esta zona costera de Colombia, lo que permite tener información básica sobre el contenido químico de las partículas atmosféricas. De esta forma, se buscó sensibilizar a las comunidades en pro de minimizar la emisión de los contaminantes atmosféricos que son liberados al ambiente, para disminuir los riesgos a la salud y favorecer la preservación de los recursos naturales.

Materiales y métodos

Muestreos

Para determinar la composición química de las partículas naturales y antrópicas, se colectaron muestras de PM_{10} en seis municipios del Departamento de La Guajira, localizado entre los $10^\circ 23'\text{--}12^\circ 28'\ \text{N}$ y $71^\circ 06'\text{--}73^\circ 39'\ \text{W}$, durante un periodo de diez meses (de marzo a diciembre de 2013), teniendo en cuenta lo establecido en el protocolo y seguimiento de la calidad del aire (10). Para la ubicación de las estaciones de muestreo se consideraron catorce puntos ubicados estratégicamente, teniendo en cuenta el área de influencia directa de la explotación minera por parte de las empresas Carbones del Cerrejón Limited y Carbones Colombianos de Cerrejón (Figura 1).



Figura 1. Mapa de la ubicación de las estaciones de monitoreo de partículas suspendidas PM_{10} en el departamento de La Guajira, Colombia (12)

Se recolectaron 140 muestras del polvo atmosférico por medio de filtros de cuarzo de 23,3 x 25,4 cm mediante muestreadores de alto volumen PM₁₀ (Thermo Scientific VFC-PM10 High Volume Air Sampler). Estos filtros cuentan con un pH ligeramente mayor a 7,5 y una eficiencia de colección del 99% de partículas > 0,3 µm de diámetro (10). Los filtros fueron acondicionados 24 h antes de pesarlos a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 45%. El tiempo de muestreo fue 24 h continuas con flujo entre 1,10 y 1,34 m³/min.

Extracción y análisis

Para la extracción acuosa de los iones solubles, cada filtro fue dividido en dos partes. A la mitad del filtro se le realizó una extracción acuosa en caliente (80 °C) para el análisis de sales solubles, con agitación magnética durante 30 min. Posterior a la extracción, se realizó filtración al vacío (filtro Whatman® de fibra de vidrio 0,45 µm) para obtener un extracto final de aproximadamente 200 mL. Este extracto fue llevado a volumen con agua desionizada en un balón aforado de 250 mL.

La solución aforada se dividió en dos fracciones, una para el análisis de cationes (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, B³⁺), adicionada con HNO₃, y la otra fracción para el análisis de aniones (Cl⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻) y amonio (NH₄⁺), preservada con CH₃Cl. Después del acondicionamiento, estas dos fracciones fueron preservadas por refrigeración a 4 °C hasta su posterior análisis (11). Los aniones y el amonio fueron analizados por espectrofotometría UV-VIS con un equipo HACH DR 5000™ UV-Vis con lámpara de tungsteno en atmósfera gaseosa (visible) y lámpara de deuterio (UV), una precisión de longitud de onda de +/- 1 nm (en el rango de longitud de onda de 200-900 nm: Cl⁻ 455 nm, NH₄⁺ 640 nm, NO₂⁻ 543 nm, NO₃⁻ 543 nm, PO₄³⁻ 885 nm, SO₄²⁻ 420 nm), reproducibilidad de longitud de onda de < 0,5 nm, resolución de 0,1 nm y velocidad de escaneo de 900 nm/min; operado en condiciones de 10 a 40 °C y humedad relativa máxima del 80% (sin condensación).

Se emplearon los siguientes estándares para la calibración: NO₃⁻, NH₄⁺, NO₂⁻, PO₄³⁻, Cl⁻ MERCK de 1000 mg/L. Los cationes fueron analizados por medio de ICP-MS (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo) con un equipo Agilent 7700 Series ICP-MS, utilizando Argón 5,0 como gas de arrastre a 0,9 L/min, bomba de nebulización a 0,4 rps, tiempo de retención de 0,3 s y la utilización de solución patrón multielemental ICP: Solutions Plus Inc. (5% HNO₃) de Na, K, B, Ca, Mg (50 ppm c/u) MERCK.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se aplicaron varios criterios como la prueba de rechazo de Chauvenet, pruebas de medias normales, con varianza y medias desconocidas t-Student, coeficiente de correlación lineal, series de tiempo (para el caso de las concentraciones en los diferentes periodos de monitoreo), análisis de correlación (entre concentración de iones) y análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) para las concentraciones en los diferentes sitios de monitoreo, con el objeto de determinar posibles asociaciones (procedimiento de rotación Varimax); mediante la utilización del software IBM SPSS Statistics versión 21. Teniendo en cuenta que durante los procesos de extracción y análisis de las muestras se pierde cantidad de masa de cada ión, se procedió a determinar los respectivos porcentajes de recuperación en muestra preparada de concentración conocida y el respectivo análisis de un filtro de cuarzo en blanco.

Estandarización del método analítico

Para la validación del método y el tratamiento de las muestras se tuvo en cuenta la evaluación de los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y de cuantificación; para la cuantificación por medio de espectrofotometría UV-VIS se tomaron como base soluciones 0,1 mg/L de cada ión, partiendo de la respectiva solución stock (1000 mg/L MERCK) y la cuantificación por medio ICP-MS tuvo en cuenta la solución patrón multielemental (50 mg/L MERCK).

Para la linealidad, se tomaron alícuotas correspondientes a seis concentraciones diferentes (0,0005 ± 11 x 10⁻⁵; 0,001 ± 17 x 10⁻⁴; 0,005 ± 18 x 10⁻⁴; 0,01 ± 0,0025; 0,1 ± 0,008 y 0,5 ± 0,006 mg/L) de las disoluciones patrón en el rango de aplicación del método (UV-VIS 0,002-0,25 mg/L, ICP-MS 0,001-0,30 mg/L). La precisión fue realizada por determinación de la desviación estándar y coeficiente de variación (CV) de los resultados del análisis, para n = 10, de muestras reales en condiciones de repetibilidad. La exactitud fue definida en términos de porcentaje de error relativo; para los estándares analizados este porcentaje de error relativo fue menor a lo esperado (< 5%) para dos analistas diferentes. La evaluación de los parámetros mencionados fue realizada para la concentración de 0,1 mg/L. Para la determinación de límite de detección y de cuantificación, se realizaron determinaciones en muestras de blancos o concentración baja del analito para n = 10.

Resultados y discusión

Control de calidad

En la Tabla 1 se muestran los resultados de los criterios tenidos en cuenta para la validación del método analítico. En general los valores registrados para este estudio, indicaron condiciones aceptables garantizando la confiabilidad de los resultados.

Tabla 1. Resultados de los parámetros de control de calidad de los métodos analíticos correspondientes a los iones

Parámetro	R	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)	Exactitud (%)	LOD	LOQ
Ión						
NH ₄ ⁺	0,99967	0,07	0,056	4,23	0,0009	0,0011
NO ₃ ⁻	0,99997	0,06	0,047	4,01	0,0009	0,0011
PO ₄ ³⁻	0,99998	0,08	0,052	3,98	0,0032	0,0055
Cl ⁻	0,99986	0,04	0,044	4,25	0,020	0,043
NO ₂ ⁻	0,99996	0,07	0,067	4,09	0,00002	0,00004
SO ₄ ²⁻	0,99995	0,03	0,045	3,88	0,0001	0,0003
B ³⁺	0,99990	0,04	0,046	4,03	0,009	0,032
Ca ²⁺	0,99993	0,06	0,055	3,35	0,030	0,053
Na ⁺	0,99998	0,05	0,049	3,89	0,017	0,040
K ⁺	0,99993	0,04	0,061	4,12	0,0005	0,0028
Mg ²⁺	0,99996	0,04	0,059	4,16	0,012	0,035

Concentraciones de partículas y de iones solubles sobre La Guajira

La influencia de los vientos y el clima semidesértico de La Guajira favorecen la resuspensión de partículas en el aire. En la zona minera del carbón, la resuspensión también se ve favorecida por las actividades de excavación y el tránsito vehicular que presenta, lo que explica una concentración media anual de $35,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (12) (Tablas 2A y 2B). Como se observa, este valor no supera el límite máximo permitido de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de acuerdo con la Norma Oficial Colombiana (13), pero es superior al propuesto por la OMS de $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Tabla 2A. Concentraciones de las especies analizadas en cada municipio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$). En todos los casos se hicieron 10 observaciones ($n = 10$)

Población	PM ₁₀	Cl ⁻ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	NH ₄ ⁺ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	NO ₂ ⁻ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	NO ₃ ⁻ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PO ₄ ³⁻ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	SO ₄ ²⁻ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Riohacha	53,1	0,22	0,030	0,00053	0,0046	0,013	0,15
Hatonuevo	36,6	0,16	0,032	0,00070	0,0063	0,013	0,23
Albania	30,2	0,20	0,029	0,00063	0,0043	0,011	0,28
Barrancas	33,6	0,19	0,014	0,0013	0,0046	0,015	0,41
Fonseca	30,2	0,17	0,046	0,0022	0,0039	0,013	0,29
San Juan	30,1	0,20	0,040	0,00054	0,0050	0,010	0,11
Promedio	35,6	0,19	0,032	0,001	0,0048	0,012	0,25

En cuanto a su contenido químico, los iones solubles de mayor concentración corresponden a SO₄²⁻ ($\bar{x} = 0,25 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 0,43$), Cl⁻ ($\bar{x} = 0,19 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 0,11$), Na⁺ ($\bar{x} = 1,98 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 1,70$), Ca²⁺ ($\bar{x} = 0,40 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 0,44$) y Mg²⁺ ($\bar{x} = 0,31 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 0,35$) (Tablas 2A y 2B). La zona con las mayores concentraciones de Na⁺ ($p = 0,402$, $\bar{x} = 3,71 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 1,57$) y Cl⁻ ($p = 0,772$, $\bar{x} = 0,216 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 0,05$) es Riohacha, localidad que se encuentra ubicada frente a la costa, lo que indica la derivación de estas especies del aerosol marino, que son arrastrados por los vientos hacia las demás zonas de La Guajira (Figura 2).

Tabla 2B. Concentración de las especies analizadas en cada municipio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$). En todos los casos se hicieron 10 observaciones ($n = 10$)

Población	Na ⁺ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	K ⁺ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	B ³⁺ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Ca ²⁺ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Mg ²⁺ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Riohacha	2,30	0,062	0,036	0,49	0,22
Hatonuevo	1,80	0,049	0,037	0,21	0,61
Albania	2,19	0,052	0,066	0,42	0,29
Barrancas	2,14	0,067	0,035	0,39	0,38
Fonseca	1,72	0,039	0,034	0,37	0,13

Las más altas concentraciones de SO₄²⁻ se registran en las zonas de Barrancas ($\bar{x} = 0,370 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 0,66$), Fonseca ($\bar{x} = 0,272 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 0,64$) y Albania ($\bar{x} = 0,274 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 0,36$), que corresponden a los sitios donde opera la mina de explotación de carbón mineral a cielo abierto (Figura 2). La correlación significativa entre Na⁺ y SO₄²⁻ ($p = 0,05$, $r = 0,578$) (Tabla 3) indica que, de manera natural, el sulfato se deriva del aerosol marino (Figura 3) (14). Como se puede observar en la Tabla 4, el sulfato es excesivo con respecto al agua de mar, el cual fue calculado usando Na⁺ como referencia y la composición del agua de mar (15) (ecuación 1).

$$X^* = X_{total} - Na_{total} \left(\frac{X_{agua\ de\ mar}}{Na_{agua\ de\ mar}} \right) \quad [1]$$

Esta información puede indicar que el sulfato en exceso, está asociado a la oxidación atmosférica del agua y otros gases o compuestos de azufre, producidos por el proceso de combustión de los vehículos automotores, como principales constituyentes del sulfato en esta zona (16). También este exceso puede atribuirse a los compuestos sulfurados producidos en el suelo y por las plantas (17).

Las emisiones de SO₂ y NO₂ provenientes de las áreas industriales se oxidan en la atmósfera a SO₄²⁻ y NO₃⁻, respectivamente, por reacciones homogéneas y heterogéneas durante su transporte (18).

Tabla 3. Matriz de correlaciones entre los iones de las partículas atmosféricas

	Cl ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	K ⁺	B ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Cl ⁻	1	0,068	-0,16	0,062	-0,380	-0,282	0,130	0,287	-0,050	-0,104	0,036
NH ₄ ⁺		1	-0,19	-0,234	0,343	0,654	0,219	0,230	-0,561	-0,175	0,052
NO ₂ ⁻			1	-0,007	0,041	-0,10	0,094	0,064	-0,156	0,127	0,121
NO ₃ ⁻				1	-0,166	-0,339	-0,410	0,002	-0,248	-0,402	0,503
PO ₄ ³⁻					1	0,409	0,085	-0,229	-0,079	-0,235	-0,115
SO ₄ ²⁻						1	0,578	0,126	0,041	-0,040	0,093
Na ⁺							1	0,492	0,363	0,217	0,180
K ⁺								1	-0,162	0,398	0,375
B ³⁺									1	0,309	-0,098
Ca ²⁺										1	-0,380
Mg ²⁺											1

Estos iones inorgánicos pueden ser neutralizados por NH₄⁺, formado por el NH₃ gaseoso que se emite en las áreas agrícolas. Ellos usualmente existen en la forma de (NH₄)₂SO₄, NH₄HSO₄ y NH₄NO₃ (19). La correlación que existe entre el SO₄²⁻ y el NH₄⁺ (0,654) indica la presencia de estos iones en la forma de (NH₄)₂SO₄ (Figura 3).

De manera general, las concentraciones de NO₃⁻ son muy bajas en todos los sitios ($\bar{x} = 0,0048 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 0,01$) (Tabla 2A). El SO₄²⁻ y NO₃⁻ son los iones ácidos en la atmósfera, sin embargo en los ambientes marinos costeros, el SO₄²⁻ es considerado la mayor especie ácida. Esto se debe a que el NH₄⁺ y NO₃⁻ contenidos en el aerosol son utilizados por el fitoplancton marino (16). Al igual que el NO₃⁻, el NH₄⁺ también se encuentra en baja concentración ($\bar{x} = 0,032 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 0,03$) (Tabla 2A), lo que indica que es poco probable la formación de NH₄NO₃ (Figura 3).

Del mismo modo, la formación de nitrato de amonio en la atmósfera está regida por el siguiente equilibrio (20) (ecuación 2).



Se observa que las concentraciones más altas de NH₄⁺ se registran en las zonas de Barrancas ($\bar{x} = 0,494 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 0,03$) y Fonseca ($\bar{x} = 0,471 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\sigma = 0,02$) (Figura 2), lo que indica que probablemente sea producto de la actividad pecuaria que se desarrolla en estos municipios. Las actividades pecuarias producen altas emisiones atmosféricas de NH₃ proveniente de los desechos o excretas del ganado (15) que conducen finalmente a la formación de amonio por conversión química. Estos municipios también se caracterizan por su actividad agrícola. Estas zonas tienen una participación agrícola del 56,3% en la economía de la región (21).

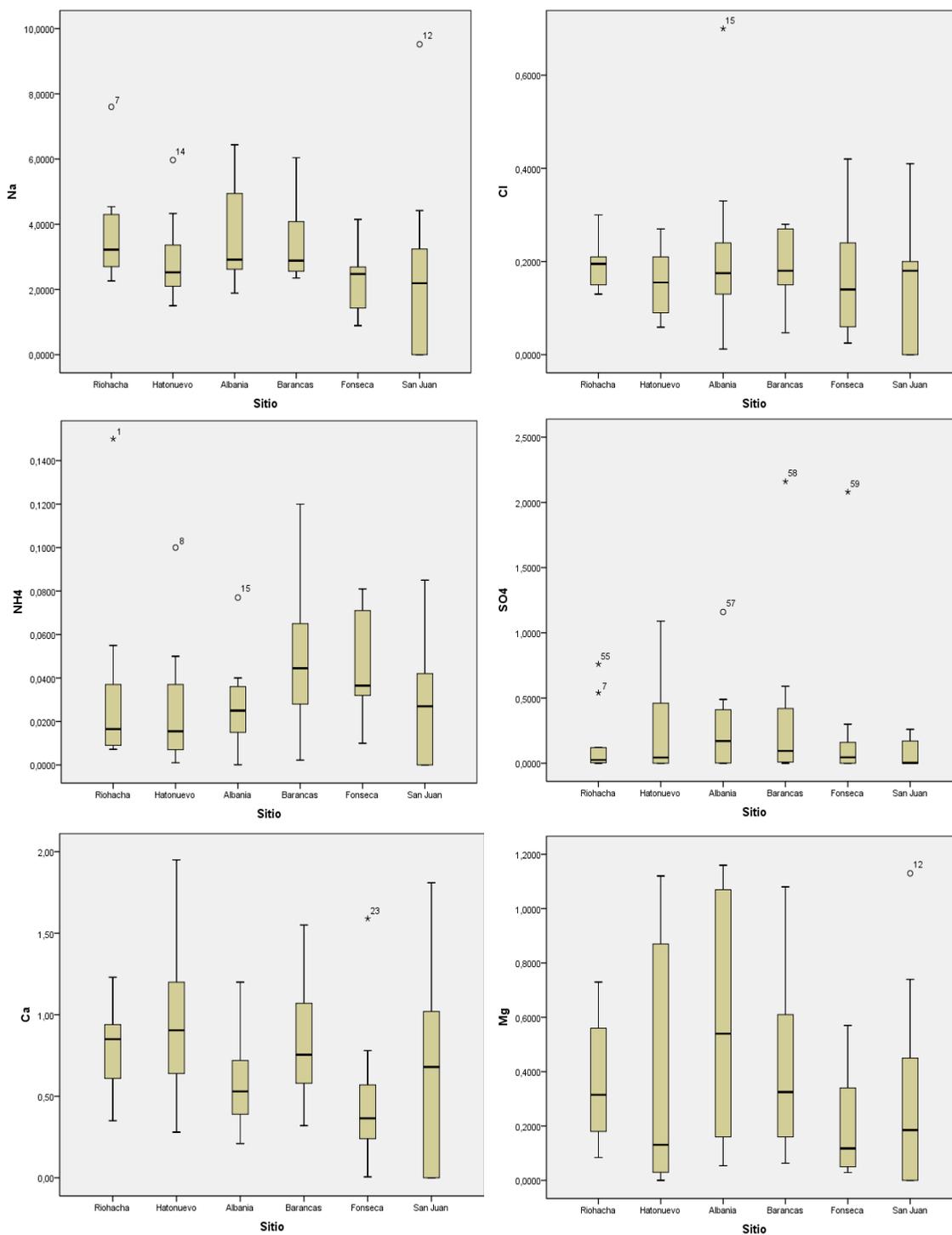


Figura 2. Variación de los iones de mayor concentración ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) en los sitios de muestreo

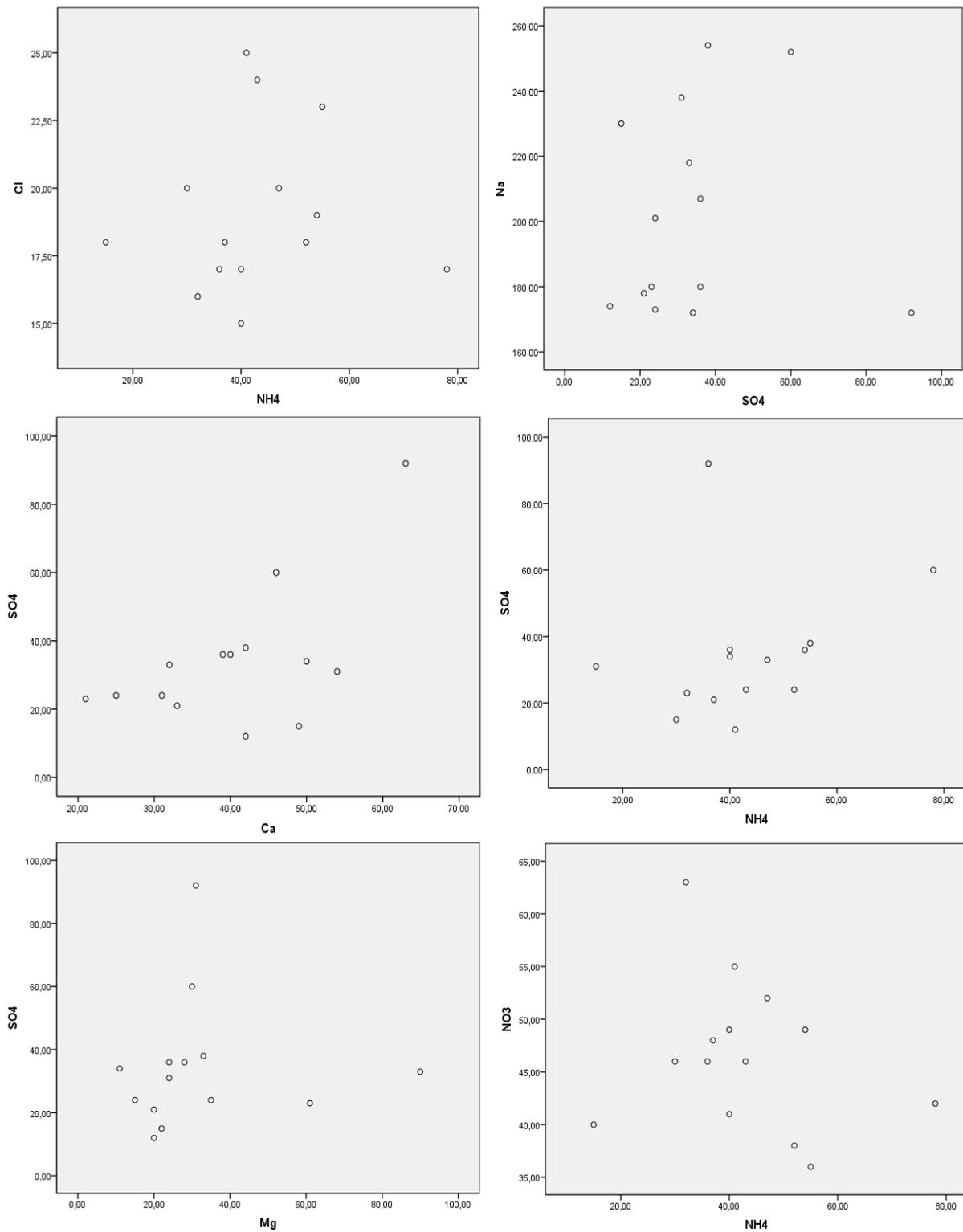
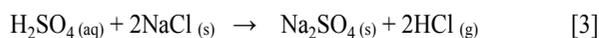


Figura 3. Correlación de iones en las partículas PM₁₀

Así mismo, la mayoría de los fertilizantes que se aplican en las prácticas agrícolas son derivados amoniacales y de la urea. Estos compuestos son hidrolizados en el suelo, gracias a la intervención de la enzima ureasa, dando lugar a la formación de carbonato de amonio (22).

En ambientes con concentraciones bajas de NH₄⁺ y elevadas de Na⁺ y/o Ca²⁺ es posible obtener también la neutralización del sulfato según las reacciones descritas en las ecuaciones 3 y 4 y la consecuente formación de sulfato sódico y cálcico particulado en suspensión (23).

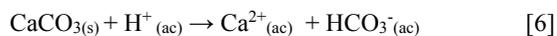


El fosfato se encuentra en concentraciones relativamente bajas, sugiriendo al menos dos fuentes diferentes. El origen del PO₄³⁻ en las partículas podría ser a través de la oxidación del PH₃ gaseoso producido en los ambientes reductores (carente de oxígeno libre y rico en gases como el metano y el amoníaco) y las heces (24, 25); la otra fuente podría corresponder a procesos biológicos que ocurren en la vegetación o en los suelos (26).

El cloruro no presenta una concentración excesiva con respecto al aerosol marino, sino que existe un déficit de este ión en las partículas, algo similar fue observado en los Llanos Centrales de Venezuela (27). Esto muestra que no existen fuentes significativas de Cl⁻ en la región. El déficit de Cl⁻ puede ser explicado por la liberación de HCl de las partículas, debido a su reacción con ácidos fuertes, según la reacción descrita en la ecuación 5 (28).



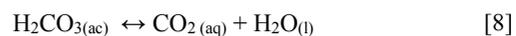
La Tabla 4 nos muestra que los excesos del Ca⁺ y Mg²⁺, con respecto al aerosol marino, son muy altos, mayores al 50%, lo que indica que la resuspensión del suelo se presenta como una fuente principal de estos iones. Lo anterior quiere decir que las concentraciones de Ca²⁺ y Mg²⁺ deben estar relacionadas con la contribución del suelo, sumada a la influencia del aerosol marino y el material particulado proveniente de la zona desértica, principalmente en la época de sequía. El calcio presente en el polvo atmosférico se encuentra en la forma de carbonatos e interviene en forma significativa en la neutralización de los ácidos atmosférico (ecuación 6).



Si el ambiente acuoso es suficientemente ácido, el ión bicarbonato establece un equilibrio con el ácido carbónico (ecuación 7).



el cual, a su vez, está en equilibrio con el CO₂ disuelto (ecuación 8).



que finalmente está en equilibrio con el CO₂ atmosférico (ecuación 9).



Es decir que, en última instancia, la acidez libre sale del sistema por emisión de CO₂ a la atmósfera (29).

Tabla 4. Exceso de concentración de los iones de las partículas con respecto al agua de mar

Ion	Concentración Atmosférica	Concentración Exceso	% exceso
Na ⁺	2,38	-	-
K ⁺	0,12	0,07	58,3
Ca ²⁺	0,59	0,48	81,3
Mg ²⁺	0,34	0,25	75,0
SO ₄ ²⁻	0,34	0,29	85,4

En un estudio efectuado en regiones de la sabana de Venezuela (30) se observó que entre 50 y 80% del contenido total de Ca y Mg en las partículas suspendidas, se encuentran en la forma insoluble (probablemente como carbonatos y compuestos orgánicos), indicando que los aerosoles de esta región tendrían un buen potencial para neutralizar ácidos gaseosos.

Distribución espacial y temporal de iones solubles en PM₁₀ sobre La Guajira

En términos generales, a excepción del Na⁺, no se observa una variación significativa de las concentraciones de los iones contenida en las partículas en los distintos sitios de estudio (Tabla 5). Esto indica, en principio, que estas especies son producidas por las mismas fuentes: el aerosol marino y la formación de aerosoles calcáreos de Mg²⁺ y Ca²⁺ provenientes del suelo por turbulencia del viento.

Para el caso del Na⁺, se puede observar que los niveles de este ión dependen de la distancia del mar a que se encuentra el lugar de mediciones, se observa alta concentración en Riohacha, que es un sitio costero; a diferencia de Fonseca y San Juan, en donde las concentraciones son relativamente bajas, en concordancia con su distancia del océano.

Tabla 5. Valores de los coeficientes de variación (CV) de las concentraciones de los iones en los sitios de muestreo

Ion	Riohacha	Hatonuevo	Albania	Barrancas	Fonseca	San Juan
Cl ⁻	0,40	0,45	0,11	0,72	0,77	0,40
NH ₄ ⁺	0,26	0,10	0,10	0,30	0,52	0,57
NO ₂ ⁻	0,37	0,24	0,26	0,13	0,13	0,53
NO ₃ ⁻	0,43	0,32	0,46	0,43	0,51	0,40
SO ₄ ²⁻	0,24	0,15	0,13	0,16	0,22	0,98
PO ₄ ³⁻	0,61	0,54	0,54	0,06	0,46	0,50
Na ⁺	0,10	0,74	0,77	0,93	0,68	0,21
K ⁺	0,18	0,25	0,25	0,19	0,21	0,22
B ³⁺	0,41	0,35	3,50	0,37	0,20	0,28
Ca ²⁺	0,10	0,26	0,12	0,18	0,16	0,10
Mg ²⁺	0,16	0,73	0,17	0,12	0,17	0,19

Con relación a la asociación de los iones en la Figura 4, que corresponde a los análisis de rotación, se indica que en el factor 1 las variables Na⁺, NH₄⁺ y SO₄²⁻ corresponden estadísticamente a iones asociados; similarmente ocurre para las variables B³⁺ y Ca²⁺ en el factor 2. Esto podría corresponder a que estas especies provienen de las mismas fuentes naturales como el aerosol marino y el suelo. Para el caso de Mg²⁺, NO₂⁻ y PO₄³⁻ resultan ser variables estadísticamente independientes, pudiéndose considerar entonces, como variables libres o también con muy poca posibilidad de tener asociaciones con las variables anteriores. La variable correspondiente a NO₃⁻ resulta independiente al no presentar asociaciones.

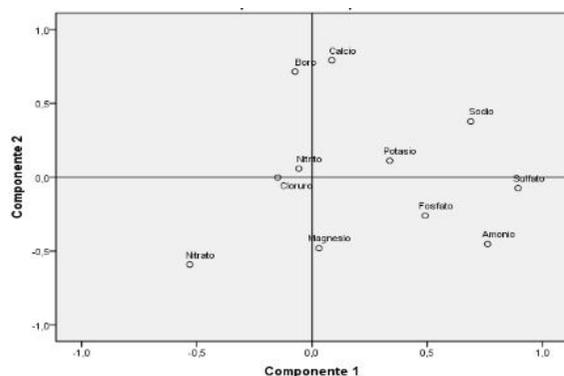


Figura 4. Matriz de factores rotados correspondientes a los iones

Así mismo, el análisis de conglomerado jerárquico, realizado para agrupar los iones teniendo en cuenta los sitios de estudio (Figura 5), indica que las partículas atmosféricas en las zonas de las poblaciones de Chancleta, Remedios, Tablazo, Papayal, Sitio Nuevo, Cañaveral, Roche y Conejo presentan similitud en cuanto al contenido químico de los iones, con variabilidad según la época del año. Teniendo en cuenta que estas poblaciones, al igual que Barrancas, Fonseca y San Juan, hacen parte de los municipios con la mayor actividad operaria de la zona minera del carbón, se puede indicar la responsabilidad de esta actividad antropogénica en la composición química del material particulado, pues durante las operaciones mineras a cielo abierto se emiten materiales alcalinos sólidos (principalmente carbonatos de calcio y magnesio) provenientes de suelo (31).

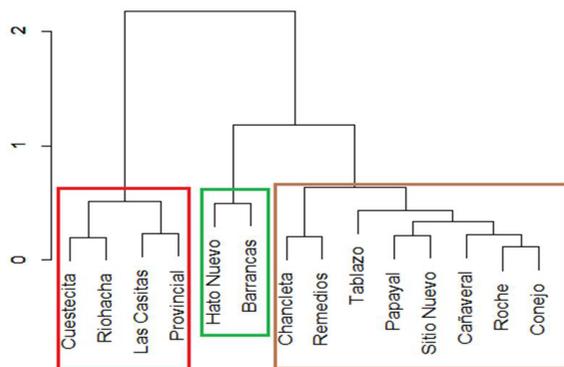


Figura 5. Dendrograma a través de enlace de Ward y matriz de distancia euclídea

La Figura 6 ilustra mayores concentraciones de iones durante el período de sequía o verano (alrededor de 50%) que en el periodo de invierno o de lluvias. El aumento en la concentraciones atmosféricas de los iones solubles en agua durante la temporada seca puede deberse a varios factores: 1) durante esta época, los vientos tienen su mayor intensidad, con predominancia en la dirección NNE (Figura 7), lo cual favorece la resuspensión de partículas al suelo y el transporte de aerosoles marinos, además posibilita el transporte de partículas suspendidas de la región desértica del norte del territorio de La Guajira; 2) las quemadas o incendios de material vegetal que se suceden en la época de sequía, en las zonas agrícolas, producen emisiones primarias de K^+ y Ca^{2+} , y emisiones secundarias de NO_3^- , SO_4^{2-} y NH_4^+ por reacción de NO_x , SO_2 y NH_3 , así mismo, se ha señalado que es posible que ocurran emisiones de Cl^- , Na^+ y Mg^{2+} (32) y 3) durante la época de lluvias, el lavado de las partículas solubles disminuye su concentración atmosférica total (33).

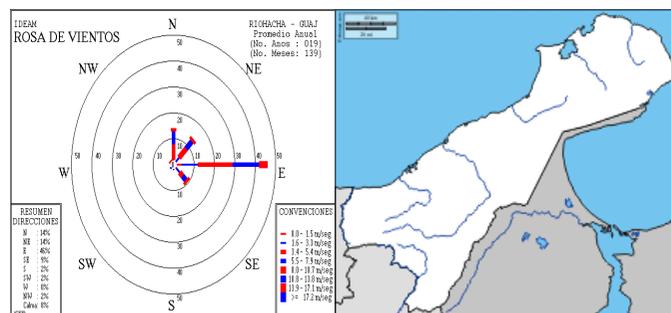


Figura 7. Rosa de los vientos. La Guajira. Colombia (12)

En Colombia, la norma correspondiente a la calidad del aire (13), no incluye límites de concentración de partículas atmosféricas para los iones determinados en este estudio. Al comparar las concentraciones de los iones de las partículas en la atmósfera de La Guajira con otras regiones del mundo, se observa (Tabla 6) que las concentraciones de Cl^- son muy bajas (entre 10 y 60 veces menor) al igual que las de Na^+ (aproximadamente 2 veces menor), comparadas con las reportadas en zonas de Venezuela muy cercanas de La Guajira colombiana, como Paraguaipoa y Maracaibo, cuyas atmósferas están influenciadas fuertemente por el aerosol marino (34, 35). El SO_4^{2-} también presenta menor concentración que el reportado para la zona de Valencia (Venezuela) (33), Atenas (36), India y Portugal (37).

Tabla 6. Comparación de concentraciones ($\mu g/m^3$) de iones solubles en partículas atmosféricas de La Guajira con otras zonas del mundo

Lugar	Cl^-	SO_4^{2-}	NO_3^-	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	NH_4^+
La Guajira (Este estudio)	0,19	0,25	0,0048	1,98	0,057	0,4	0,31	0,032
Paraguaipoa (Venezuela) (34)	12,5	1,2	0,1	4,1	0,3	0,5	0,9	
Maracaibo (35)	2,8	3,2	1,5	2,5	0,2	6,6	0,8	
Valencia (33)	2,2	1,71	9,28					
India (36)	4,3	2,0	1,32					
Amazonas (Brasil) (27)	0,10	0,42	0,21	0,13	0,10			2,0
Portugal (37)	11,7	5,71	1,77					
Atenas (34)		14,64	4,84					
Alemania (zona rural) (40)			5,20					

Esta diferencia en cuanto a concentraciones de especies químicas en las PM_{10} en La Guajira, con respecto a otras zonas del mundo, podría estar relacionada con la particularidad de eventos astronómicos y geográficos muy marcados de esta zona, que generan ambientes climáticos contrastantes: el movimiento de las corrientes marinas cálidas en la Costa norte de Colombia, la intensidad de los vientos alisios del noreste, aunado a la presencia de cadenas montañosas en la zona sur que detienen los vientos. Es de considerar además la ubicación de La Guajira en la pequeña región de calma ecuatorial que separa los movimientos de las masas de aire en los dos hemisferios, lo que dificulta el intercambio de contaminantes entre éstos, causando la existencia de cierta asimetría en cuanto a la distribución de los contaminantes en ambos hemisferios.

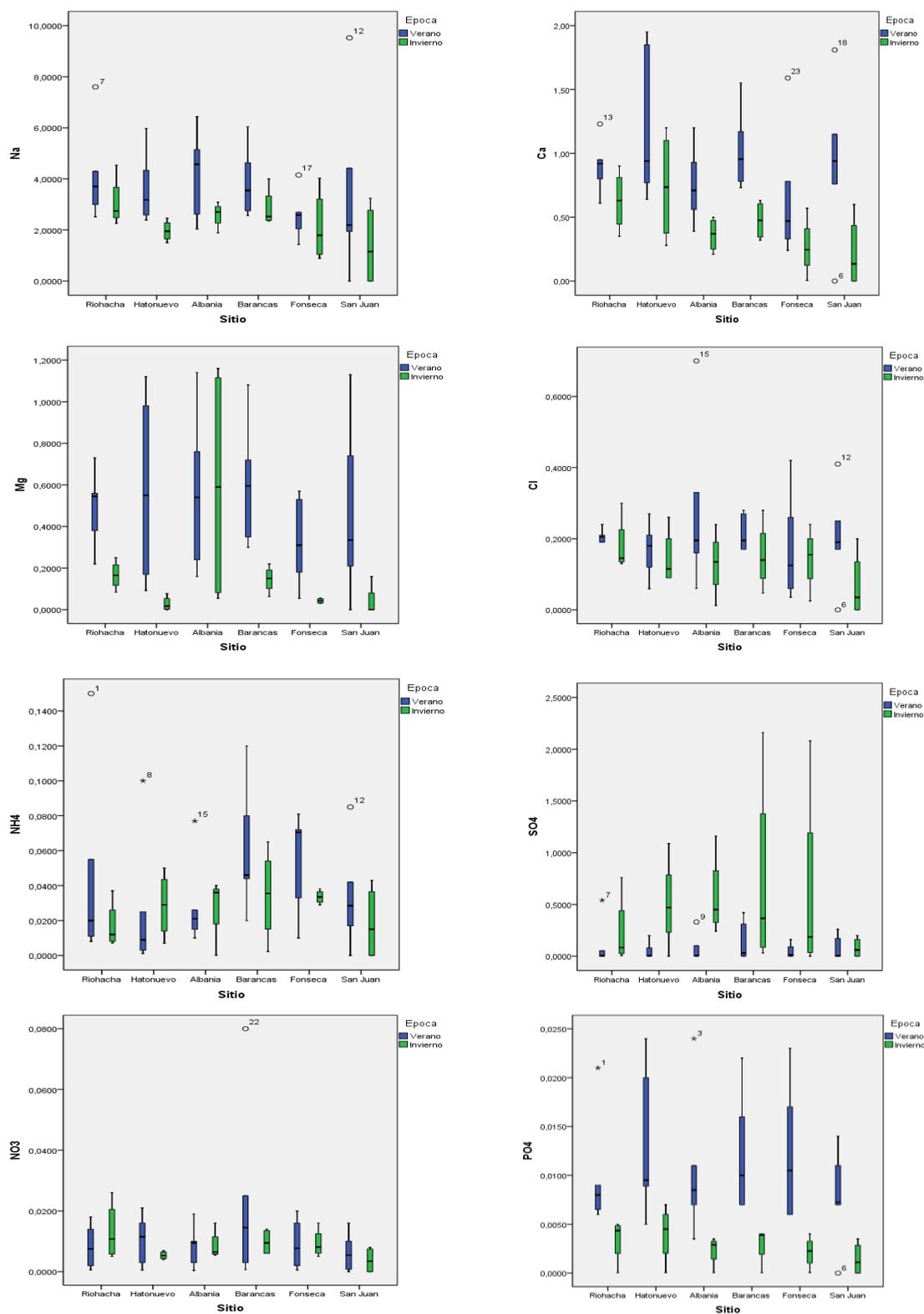


Figura 6. Variación estacional de las concentraciones ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) de iones en las partículas atmosféricas PM₁₀ La Guajira, Colombia

Esta situación conlleva a que se observen mayores niveles de especies químicas y/o contaminantes en el hemisferio norte que en el sur. Además se debe tener en cuenta que la proporción del océano, que es el principal sumidero de contaminantes atmosféricos, respecto a la superficie continental es significativamente mayor en el hemisferio sur que en el norte (38).

Conclusiones

La atmósfera de La Guajira constituye un sistema muy dinámico que recibe emisiones de contaminantes de partículas y gases provenientes de fuentes naturales y antrópicas, los cuales son removidos de la atmósfera mediante los procesos de deposición húmeda y seca. Las PM_{10} se encuentran constituidas químicamente en su mayoría por Na^+ ($1,98 \mu g/m^3$), Cl^- ($0,19 \mu g/m^3$), SO_4^{2-} ($0,25 \mu g/m^3$), Ca^{2+} ($0,40 \mu g/m^3$) y Mg^{2+} ($0,31 \mu g/m^3$). Las concentraciones de los iones analizados presentan un descenso en la época de lluvia, casi en un 50%, siendo las concentraciones de Ca^{2+} ($p = 0,0$), Mg^{2+} ($p = 0,0$) y PO_4^{3-} ($p = 0,0$) las más marcadas.

En general (a excepción del Na^+) los iones no presentan variación espacial significativa, ello sugiere una homogeneidad de las fuentes, y ningún impacto significativo directo de otras fuentes puntuales (incendios forestales, quemados en épocas de sequía, circulación de vehículos) sobre la composición química de la atmósfera regional.

Más del 50% del K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y SO_4^{2-} presente en el área de estudio es de origen no marino, indicando una fuente adicional que puede ser el suelo, debido a los procesos de resuspensión de partículas influenciado por el viento y las actividades mineras del carbón a cielo abierto. Por su parte, los niveles de amonio son bajos, lo que indica que esta especie se encuentra neutralizando al ácido sulfúrico. Los niveles de fosfato son bajos y se discute su posible formación a partir de la fosfina gaseosa. Las concentraciones de los iones en La Guajira resultaron inferiores a los reportados en la bibliografía para otros estudios realizados en zonas muy cercanas como Venezuela y otras del mundo.

Referencias

1. AMBIENTEC. *Diseño de una red de monitoreo de recurso aire para los municipios y el corredor del transporte del carbón*. La Guajira, Riohacha, **1999**.
2. Estévez, A.; Montero, A.; López, S.; González, P.; Hernández, I.; Pérez, A. *et al.* Biomonitorio de la contaminación atmosférica en La Habana durante la campaña 2004-2005. *Nucleus*, **2010**, 50.
3. Quijano, A.; Quijano, M.; Henao, J. Caracterización físicoquímica del material particulado fracción respirable $PM_{2.5}$ en Pamplona Norte de Santander-Colombia. *Bistua*, **2010**, 8 (1), 53-66.
4. Chong, N.; Sivaramkrishnan, K.; Wells, M.; Jones, K. Characterization of inhalable particulate matter in ambient air by scanning Electron microscopy and Energy-dispersive X-ray analysis. *EJEAFC*, **2002**, 1 (3), 145-164.
5. Sanhueza E.; Crutzen P. Budget of fixed nitrogen in the Orinoco savannah region: The role of pyrodenitrification. *Global Biogeochem. Cycles*, **1998**, 12 (4), 653-666.
6. Piñeiro, M.; López, P.; Muniategui, D.; Prada, X.; Querol, A.; Alastuey, A. A new method for the simultaneous determination of PAH and metals in samples of atmospheric particulate matter. *Atmos. Environ.* **2003**, 37 (29), 4171-4175.
7. Corporación Autónoma Regional de La Guajira-Corpoaguajira. Condiciones climáticas de La Guajira año 2013. División de Control y Monitoreo Ambiental, Reporte Anual, Riohacha, **2014**.
8. ICLAM. Evaluación de la calidad del aire en los municipios Maracaibo, San Francisco y Paéz. Niveles y Tendencias. 1995-2003. Estado Zulia, Venezuela, **2004**.
9. Doménech, X. Química Atmosférica: origen y efectos de la contaminación. Miraguano Ediciones; Madrid, España, **1995**.
10. MADS, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Protocolo para el monitoreo y seguimiento de la calidad del aire. 1ª edición. Bogotá, Colombia, **2010**.
11. Doria, C. Estudio sobre la composición química de la lluvia y partículas suspendidas en un sitio del área de influencia de las actividades de explotación del carbón mineral en La Guajira Colombiana. Tesis de maestría, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, **2002**.
12. Corpoaguajira- Corporación Autónoma Regional de La Guajira. Fortalecimiento y operación del sistema de vigilancia de la calidad del aire (SVCA) de Corpoaguajira en todo el departamento de La Guajira. Informe Especial de Avances Técnicos, Riohacha, **2015**.
13. MAVDT-Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Resolución 610 "Por la cual se modifica la resolución 610 del 14 de Abril del 2006. Bogotá, **2010**.
14. Pacheco, M.; Sanhueza, E.; Romero, J. Química atmosférica en la Gran Sabana II: Distribución de tamaño y composición de los aerosoles solubles en agua. *Interiencia*, **2005**, 30, 602-610.
15. Sanhueza, E.; Rondón, A. Particle-Size Distribution of inorganic water soluble ions in the Venezuelan Savannah atmosphere during burning and nonburning periods. *J. Atmos. Chem.* **1988**, 7, 369-388. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00058711>.
16. Kai, Z.; Yuesi, W.; Tianxue, W.; Yousef, M.; Frank, M. Properties of nitrate, sulfate and ammonium in typical polluted atmospheric (PM10). *Beijing. Atmos. Res.* **2007**, 84, 67-77. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2006.05.004>.
17. Nakamura, T.; Matsumoto, K.; Uematsu, M. Chemical characteristics of aerosols transported from Asia to the East China Sea. An evaluation of anthropogenic combined nitrogen deposition in autumn. *Atmos. Environ.* **2005**, 39, 1749-1758. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.11.037>.
18. Pope, C.; Thun, M.; Namboodiri, M.; Dockery, D.; Evans, J.; Speizer, F. *et al.* Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1995**, 151 (3), 669-674. DOI: https://doi.org/10.1164/ajrcm/151.3_pt_1.669.
19. Paerl, H. Enhancement of marine primary production by nitrogen-enriched acid rain. *Nature* **1985**, 315, 747-749. DOI: <https://doi.org/10.1038/315747a0>.
20. Singh, H. Reactive nitrogen in the troposphere. *Environ. Sci. Technol.* **1987**, 21 (4), 320-327. DOI: <https://doi.org/10.1021/es00158a001>.
21. Otero, A. Rio Ranchería: Entre la Economía, la biodiversidad y la cultura. En *Documentos de Trabajo sobre economía regional*, Banco de la República, Cartagena, 2013.

22. Vallero, D. Environmental contaminants: assessment and control. Elsevier Academic Press. USA, 2004.
23. Hitchcock, D.; Spiller, L.; Wilson, W. Sulfuric acid aerosols y HCl release in coastal atmospheres: evidence de rapid formation on sulfuric acid particulates. *Atmos. Environ. (1967)*. **1980**, *14* (2), 165-182. DOI: [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(80\)90275-9](https://doi.org/10.1016/0004-6981(80)90275-9).
24. Dévai, I.; Felföldy, L.; Wittner, I.; Plosz, S. Detection of phosphine: new aspects of the phosphorus cycle in the hydrosphere. *Nature* **1988**, *333*, 343-345. DOI: <https://doi.org/10.1038/333343a0>.
25. Jeongwon, K.; Byung, Ch.; Chang-Bok, L. Atmospheric transport of water –soluble ions (NO₃⁻, NH₄⁺ and nss-SO₄⁻²) to the southern East Sea (Sea of Japan). *Sci. Total Environ.* **2010**, *408*, 2369-2377. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.02.022>.
26. Han, S.; Zhuang, Y.; Liu, J.; Glindemann, D. Phosphorus cycling through phosphine in paddy fields. *Sci. Total Environ.* **2000**, *258*, 195-203. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697\(00\)00570-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697(00)00570-2).
27. Arias, M. Depositiones atmosféricas de Compuestos solubles en agua en la Sabana Venezolana. Tesis de Maestría. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Centro de Estudios Avanzados, Caracas, **1989**.
28. Calvert, J.; Lazrus, A.; Kok, G.; Heikes, B.; Walega, J.; Lind, J. *et al.* Chemical mechanism of acid generation in the tropospheric. *Nature* **1985**, *317*, 27-35.
29. Wayne, R. *Chemistry of atmosphere*. Clarendon Press: Oxford, USA, **1985**.
30. Morales, J.; Hermoso, M.; Serrano, H.; Sanhueza, E. Trace elements in the Venezuelan savannah atmosphere during dry and wet periods, with and without vegetation burning. *Atmos. Environ., Part A*. **1990**, *24* (2), 407-414. DOI: [https://doi.org/10.1016/0960-1686\(90\)90121-3](https://doi.org/10.1016/0960-1686(90)90121-3).
31. Angulo, L.; Huertas, J.; Restrepo, G. Caracterización de Partículas Suspendidas (PST) y Partículas Respirables (PM10) producidas en Áreas de Explotación Carbonífera a Cielo Abierto. *Inf. Tecnol.* **2011**, *22* (4), 23-34. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/s0718-07642011000400004>.
32. Park, S.; Ondov, J.; Harrison, D.; Nair, N. Seasonal and shorter-term variations in particulate atmospheric nitrate in Baltimore. *Atmos. Environ.* **2005**, *39* (11), 2011-2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.12.032>.
33. Martínez, Y. Partículas suspendidas totales y contenido de nitrato, cloruro y sulfato en el aire de dos zonas de Valencia. *Rev. Ing. UC*. **1997**, *174*, 163-172.
34. Morales, J. Estudio sobre la composición química de las deposiciones atmosféricas en la cuenca del Lago de Maracaibo. Trabajo de Doctorado. Universidad Central de Caracas, Caracas, **1992**.
35. Sánchez, L. Estudio sobre la remoción de contaminantes atmosféricos en el aire de la ciudad de Maracaibo. Trabajo de Maestría. Universidad del Zulia, Maracaibo, **1998**.
36. Varma, G. Impact of soil-derived aerosols on precipitation acidity in India. *Atmos. Environ. (1967)* **1989**, *23*, 2723-2728. DOI: [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(89\)90552-0](https://doi.org/10.1016/0004-6981(89)90552-0).
37. Galloway, J.; Likans, G.; Keene, W.; Miller, J. The composition in remote areas of the world. *J. Geophys. Res.* **1982**, *87*, 8771-8786. DOI: <https://doi.org/10.1029/jc087ic11p08771>.
38. Mehlmann, A.; Warneck, P. Atmospheric gaseous HNO₃. Particulate nitrate, and aerosol size distribution of major ionic species at a rural site in Western Germany. *Atmos. Environ.* **1995**, *29*, 2359-2373. DOI: [https://doi.org/10.1016/1352-2310\(95\)00056-5](https://doi.org/10.1016/1352-2310(95)00056-5).

Article citation:

Doria-Argumedo, C.; Fagundo-Castillo, J. Caracterización química de material particulado PM₁₀ en la atmósfera de La Guajira, Colombia. *Rev. Colomb. Quim.* **2016**, *45* (2), 19-29. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.56991>.

Nanostructured MnO₂ catalyst in *E. crassipes* (water hyacinth) for indigo carmine degradation

Catalizador de MnO₂ nanoestructurado en *E. crassipes* (jacinto de agua) para la degradación de índigo carmín

Catalisador de MnO₂ nanoestruturado em *E. crassipes* (jacinto da água) para a degradação do índigo carmim

Abstract

The use of water hyacinth's dried matter (*Eichhornia crassipes*) as a support matrix for nano-MnO₂ and its application for the removal of indigo carmine (IC) was studied. Different pretreatment processes were tested and results indicated that an acid-alkali pretreatment is an efficient method to binding nanoparticles (NPs) to cellulosic matrix. In addition, the MnO₂ NPs were synthesized by sonochemical reduction of MnO₄⁻ using different methods (ultrasonic horn system, ultrasonic bath and reaction with ethanol), where the influence of the precursor concentration was observed. The synthesized material was further characterized by ATR-IR, AAS, XRD, SEM, nitrogen isotherms adsorption, EDS, and pH_{pzc}. The IC removal capacity of the nanostructured material, the chemical nature of the degradation products and the effect of various parameters (temperature, pH, initial IC concentration, among others) were explored in water samples.

Keywords: *Eichhornia crassipes*, indigo carmine, nanostructured material, manganese oxide.

Resumen

Se estudió el uso de la materia seca del jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) como matriz-soporte para nano-MnO₂ y su eficiencia en la eliminación de índigo carmín (IC). Se ensayaron diferentes procesos de pretratamiento y los resultados indicaron que un tratamiento previo ácido-alcálico es un método eficiente para unir las nanopartículas (NPs) a la matriz celulósica. Así mismo, las NPs de MnO₂ se sintetizaron por reducción sonoquímica de MnO₄⁻ utilizando diferentes métodos (un sistema emisor de ultrasonido, baño de ultrasonido y reacción convencional con etanol como medio). El material sintetizado se caracterizó por ATR-IR, AAS, DRX, SEM, isothermas de adsorción de nitrógeno, EDS y pH_{pzc}. Se exploró la capacidad de eliminación de IC por parte del material nanoestructurado y la naturaleza química de los productos de degradación en muestras acuosas. Se analizó el efecto de diversos parámetros tales como temperatura, pH, concentración inicial de IC, entre otros.

Palabras clave: *Eichhornia crassipes*, índigo carmín, materiales nanoestructurados, óxido de manganeso.

Resumo

Foi estudada a utilização de matéria seca de jacinto de água (*Eichhornia crassipes*) como matriz de suporte para nano-MnO₂ e sua aplicação para a remoção de índigo carmine (IC). Diferentes processos de pré-tratamento foram testados e os resultados indicaram que o pré-tratamento ácido-álcali é um método eficiente para ligar os NPs à matriz celulósica. Além disso, as NPs de MnO₂ foram sintetizadas por redução sonoquímica de MnO₄⁻ utilizando diferentes métodos (um sistema emissor de ultrassom, banho de ultrassom e a reação com o etanol). O material sintetizado foi caracterizado por ATR-IR, AAS, DRX, SEM, isothermas de adsorção de nitrogênio, EDS e pH_{pzc}. A facilidade de remoção de IC por o material nanoestruturado e a natureza química da degradação dos produtos foram explorados em amostras aquosas, assim mesmo foi estudado o efeito de vários parâmetros (temperatura, pH, concentração inicial de IC e a quantidade de nanocompósito, entre outros).

Palavras-Chave: *Eichhornia crassipes*, índigo carmim, material nanoestruturado, óxido de manganês.

Introduction

Nowadays, large amount of several synthetic dyes are used in textile, pharmaceutical, cosmetics, beverages, and electronic components industries. Around 10-15% of these dyes, employed by textile industry, are released into effluents, polluting both surface and ground water (1, 2).

Indigo (IN) or 2,2'-bis-indole, a blue synthetic dye, is one of the most consumed dyes in the industry, mainly employed for clothes dyeing. In order to enhance its solubility and improve the dyeing process, IN is often transformed into indigo carmine (IC) (indigo disulphonic 5-5') (3, 4). However, in spite of its extensive use, IC has been linked to high toxicity (5).

The environmental and health concern of these potential pollutants in water has drawn attention of many researches (6). In this regard, the application of metal oxide nanoparticles for treatment of contaminated effluents by dyes has become another challenging field in recent years. Manganese oxides, for instance, exhibit outstanding structural multiformity as well as special magnetic and electrochemical properties. Therefore, manganese oxide catalysts show considerable activity in oxidation-reduction reactions (7-9).

Similarly, nanomaterials have wide applications as catalysts for dyes degradation (1, 7-11). The application of metal oxides in nano-size, however, has several engineering limitations that restrict its large-scale implementation. For example, these materials occasionally cause the leaching of nanoparticles (NPs), along with the treated effluent, resulting in even more serious environmental problems. Some of these limitations can be prevented by anchoring the nanoparticles on suitable matrices (9).

The water hyacinth (WH, *Eichhornia crassipes*), which is a widely prevalent aquatic weed in India, Australia, Africa, and South America, reproduces itself in five days under favorable conditions, obstructs oxygen transfer in water bodies and affects aquatic ecosystems. For this reason, it is considered one of worst invasive aquatic plants (12, 13). In spite of that, WH is an inexpensive, readily available biomass resource, which has been widely investigated for its high adsorption capacity (2, 14-16).

For the previous reasons, in this research, the use of dried matter of WH as a support matrix for MnO₂ NPs for removing IC from waste effluents was studied.

Materials and methods

Materials

Fresh WH plants were raised from stolons obtained from Muña Dam area in Colombia. The plants were placed in a clean water reservoir (4° 35'10"N, 74°18' 0"W) at environmental conditions (day/night temperatures: 13-11°C/10-8°C). After the plant has reached an approximate length of 35 cm, the plants were extracted, washed several times, and dried at 80 °C for 24 h. Then, they were cut into small pieces (5 to 3 cm in length), and finally the plants were grounded with a ball mill.

Reagents

Potassium permanganate, sodium hydroxide, sulfuric and hydrochloric acid, indigo carmine, and ethanol, were purchased from Sigma Aldrich®. All chemicals and reagents used were analytical grade and used as received.

WH pretreatment

The biomass samples were treated at different pretreatment conditions. In all cases, the biomass was dried at 80 °C for 24 h after each pretreatment (Diagram 1).

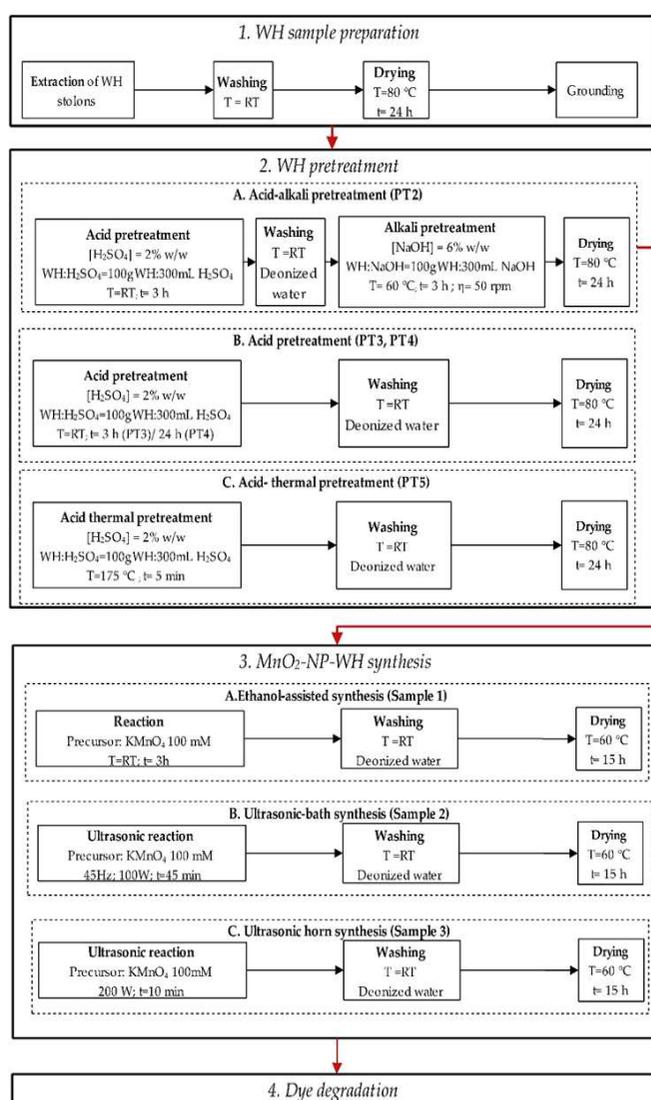


Diagram 1. Description of methodology

Acid-alkali pretreatment (PT2)

Prepared biomass was immersed in a 2% (v/v) H₂SO₄ aqueous solution for 3 h at room temperature. After that, it was immersed in a 6% (w/v) NaOH aqueous solution for 3 h at 60 °C.

Acid pretreatments (PT3 and PT4)

Prepared biomass was immersed in a 2% H₂SO₄ (v/v) aqueous solution for 3 h (PT3) and 24 h (PT4) at room temperature.

Acid-thermal pretreatment (PT5)

Prepared biomass was immersed in a 2% H₂SO₄ (v/v) aqueous solution for 5 min at 175 °C.

MnO₂-NP-WH synthesis

The bionanocomposite obtained by PT2 was synthesized by three different methods (Diagram 1).

Ethanol-assisted synthesis (sample 1)

After analysis of pretreatment methods, PT2 sample was immersed in a KMnO₄ (100 mM) solution for 3 h. Ethanol was added dropwise under constant stirring conditions leading to the formation of a brownish precipitate of MnO₂.

Ultrasonic-bath synthesis (sample 2)

Pretreated biomass was immersed in the precursor solution KMnO₄ (100 mM) and the mixture was irradiated with ultrasound waves (45 Hz, 100 W) in a Branson 2510DTH (Branson[®] Sigma-Aldrich) for 45 min.

Ultrasonic horn synthesis (sample 3)

Pretreated biomass was submerged in the precursor solution KMnO₄ (100 mM) and the mixture was irradiated with ultrasound waves using an ultrasonic horn of a Sonifier[®] S-250D operating at 200 W for 10 min. The formation of MnO₂ was verified by UV-Vis at 530 and 320 nm for MnO₄⁻ and MnO₂, respectively.

Dye degradation experiments and catalyst reuse

The degradation tests were performed in 50 mL of IC solution (concentration range of 20-800 ppm) at 150 rpm, at several pH (2.3, 4.5 and 7.0) and changing the temperature (23, 40 and 60 °C). A known amount of MnO₂-NP-WH (500 mg) catalyst was added to this solution and the degradation process was followed using the corresponding absorbance at $\lambda = 600$ nm (UV-Vis spectra were measured in a Thermo Scientific Evolution 300 UV-Vis spectrophotometer). Control experiments were done with non-modified WH, pretreated WH, and also activated carbon, evaluated as absorbent solid. Before the degradation reaction took place, the pH of the IC initial solution was adjusted by adding 0.2M HCl or 0.1 M NaOH to the reaction mixture in order to evaluate different pH conditions.

Finally, the reuse potential of MnO₂-NP-WH catalyst was tested without previous regeneration, that is, after attaining equilibrium (according to UV-Vis), the used MnO₂-NPWH was carefully removed from the just degraded solution and immediately immersed in a new IC solution, which was monitored again by UV-Vis. To verify the IC degradation capacity, several cycles of consecutive adsorption studies were performed.

Characterization

The moisture content of WH samples was determined using an AMB 50 Moisture Balance Adam Equipment. In addition, ATR-IR spectra were taken with a Nicolet[™] iS[™] 10 FT-IR Spectrometer (Thermo Fischer Scientific) at 4000-650 cm⁻¹. The surface area of the samples was measured using an AUTOSORB[®]-1 Series (Quantachrome Instruments); XRD analysis was performed on a PANalytical X'Pert PRO MRD diffractometer; SEM analysis was taken on a LEO 1550 SEM/EDS instrument. Before EDX analysis, the samples were coated with 3 nm platinum and the micrographs were taken at 10 kV. Moreover, a Thermo Electron S4 AA spectrometer, equipped with a manganese hollow cathode lamp and an acetylene-air flame, was used for the atomic absorption spectroscopy analyses (AAS) to quantify the Mn content, deposited on the WH (following the National Environment Protection Council procedure (17)), and to determine de Mn, leached to the reaction mixture (17).

IC degradation products were identified by mass spectrometry (MS) using a Bruker Daltonics amaZon X, ESI-Ion Trap Mass Spectrometer operating in negative mode. pH at the point of zero charge (pH_{pcz}) was determinate using titration methodology; 45 mL of KNO₃ to 1% (v/v) were adjusted for initial pH in the range of 2 to 10 by adding HCl 0.1 M or NaOH 0.1 M, the volume of each solution was completed up to 50 mL by adding KNO₃ to 1% (v/v); 0.1 g of fique fiber (raw, pretreated or cationized) was added and kept under constant temperature (25 °C) and agitation for 24 h and then pH values of the supernatants were registered.

Results and discussion**Dye degradation experiments and catalyst reuse**

The objective of the biomass pretreatment was the removal of lignin and hemicellulose, cellulose crystallinity decrease, and the material porosity improvement, so that MnO₂ NPs could effectively bind to the cellulose matrix. According to Table 1, the acid-alkali pretreated WH (PT2) exhibited the largest surface area (6.74 m²/g), which is six times the surface area showed by the WH biomass before any chemical modification. Although the surface area of WH biomass reported by others (1.80-4.50 m²/g) (14-16) clearly differs from the value found in this study (1.28 m²/g), this could be explained by the different growth conditions of the WH plants evaluated in each study.

Table 1. Surface area for pretreated WH

Sample	Surface area (m ² /g)
WH	1.28
Pretreated WH (PT2)	6.74
Pretreated WH (PT3)	3.56
Pretreated WH (PT4)	5.44
Pretreated WH (PT5)	6.57
Comercial Activated Carbon	634.2

Lignin, hemicellulose, and cellulose content onto the WH biomass surface after the pretreatment, was evaluated by ATR-IR, and the results suggested, similarly to previous reported studies in other lignocellulosic materials (18-20), that the combined pretreatment method acid-alkali (PT2) is the best suitable method to obtain much better activated biomass surface (Figure 1). The normalized FT-IRs show that the acid-alkali pretreatment increases the –OH signal in comparison with the WH untreated, which suggest that more –OH groups are exposed, leading to a higher number of centers for NPs growth. This is further supported by the increase of the signals for C-O-C bonds (1008-1109 cm⁻¹), assigned in previous reports to an increase in the cellulose content on the material surface. In other words, PT2 has a lower lignin-hemicellulose and greater cellulose content than any other sample analyzed, including the WH untreated.

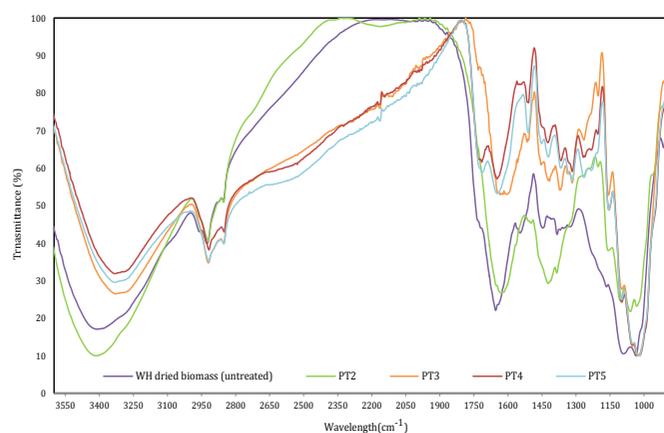


Figure 1. ATR-IR spectra of the pretreated WH samples

The positive results for the combined acid-alkali pretreatment can be explained because the H₂SO₄ pretreatment can effectively dissolve the hemicelluloses (xylan) and increase the enzymatic digestibility of cellulose, achieving high reaction rates in comparison with the enzymatic processes (21, 22). Furthermore, it is known that the main effects of NaOH pretreatment on lignocellulosic materials, such as the WH biomass are, firstly, the delignification by breaking the ester bonds cross-linking lignin and xylan, and secondly, the increase of the hemicellulose solubility (19, 23).

Due to this alkali pretreatment, a large number of hydroxyl groups (R-CH₂-OH), contained in the biological tissues, are converted in salts (R-CH₂-ONa) and incorporated into the biological templates. Because of the resulting high porosity and ionic environment, the MnO₄ accesses the hierarchical pore channels and forms MnO₂ NPs inside the pores more easily (19). Additionally, the NaOH causes the swelling of the biomass, which increases the internal surface area of the WH and decreases the cellulose crystallinity (24).

NP synthesis

As mentioned above, for this study the NPs deposition was carried out by two principal methods: ethanol and ultrasonic assisted synthesis (sonochemical reaction). In both cases, the pretreated yellowish WH biomass (obtained after PT2) was immersed in the KMnO₄ precursor solution to replace Na⁺ for MnO₄⁻ ions into the R-CH₂-ONa centers formed during the pretreatment. Subsequently, the MnO₄⁻ ions over the WH surface were reduced either by the addition of ethanol or by the ultrasonic waves to finally deposit MnO₂ NPs onto the WH.

On the one hand, in the ethanol-assisted synthesis, the KMnO₄ present in the precursor solution acts as an oxidizing agent in neutral medium, water in this case. The ethanol is oxidized into acetic acid and permanganate is reduced, leading to the precipitation of MnO₂ and to the KOH formation (25). On the other hand, and regardless the ultrasonic waves generation method (bath or horn), the sonochemical reduction of MnO₄⁻ proceeds according to the following reaction [1], where the H₂ comes from the sonochemical dissociation (by radicals formation) in the aqueous solution.



In other words, acoustic cavitation from ultrasonic synthesis produces reactive radicals, which exhibit extremely high cooling rates and can effectively reduce metal ions to metallic nanoparticles or metal oxide nanoparticles (19, 20).

In this study, the formation of MnO₂ was verified by UV-Vis at 530 and 320 nm for MnO₄⁻ and MnO₂, respectively; and the pH values during the synthesis were verified too. In this regard, the pH increases from 7.3 to around 11.2 during the reactions, due to the production of OH⁻ ions ([1]). An abrupt change of color was observed after all synthetic methods, starting from the characteristic dark purple of aqueous permanganate to a yellowish color at the end of the reaction, similar to the observations reported in other studies (20).

Characterization

As mentioned above, the AAS technic was used to quantify the Mn content deposited on WH, following the National Environment Protection Council procedure (17). The highest percentage of Mn on WH surface was found for sample 1 (33.3%, w/w), which could be explained by the longest contact time of the activated WH biomass with the KMnO₄ solution (100 mM, 3h). On the contrary, the ultrasonic syntheses (sample 2 and 3) were performed during 45 and 10 min and the percentages of Mn deposited on each of these surfaces were 21.7 and 28.8% (w/w), respectively (Table 2). The periods of time for each method were determined according to the equipment capacity and previous studies reporting successful MnO₂ NPs synthesis at the same conditions. According to the analysis by electron microscopy, the Mn particles deposited on the WH biomass have at least one dimension in the order of nanometers, it is possible to say that most of Mn was deposited as NPs.

Table 2. Mn content on WH by different NPs synthesis methods

Sample	MnO ₂ -NP-WH synthesis	Contact time (min)	Mn on WH (% w/w)
MnO ₂ -NP-WH (Sample 1)	Ethanol assisted	180	33.32
MnO ₂ -NP-WH (Sample 2)	Ultrasonic-bath	45	28.74
MnO ₂ -NP-WH (Sample 3)	Ultrasonic horn	10	21.67

Although the percentages of Mn deposited on samples 2 and 3 were both lower in comparison with sample 1, the contact time for the NPs synthesis related with each method must be taken into consideration: sample 1 needed more than 4 times the contact time needed by sample 3 and approximately 21 times the contact time needed by sample 2, suggesting that the ultrasonic synthesis is more effective for the case of study.

The synthesized MnO₂-NP-WH catalyst, as well as the untreated and the acid-alkali pretreated WH (PT2), were analyzed by XRD in order to describe the crystallinity and structural properties before and after the MnO₂ NPs formation. The XRD patterns showed in all cases a peak around $2\theta=23^\circ$ (Figure 2a), which has been attributed to the high intensity (002) plane of crystalline cellulose (9, 26). At this 2θ , WH PT2 showed the most intense peak, confirming that the cellulose content increases as a consequence of the pretreatment, in comparison to the dried WH.

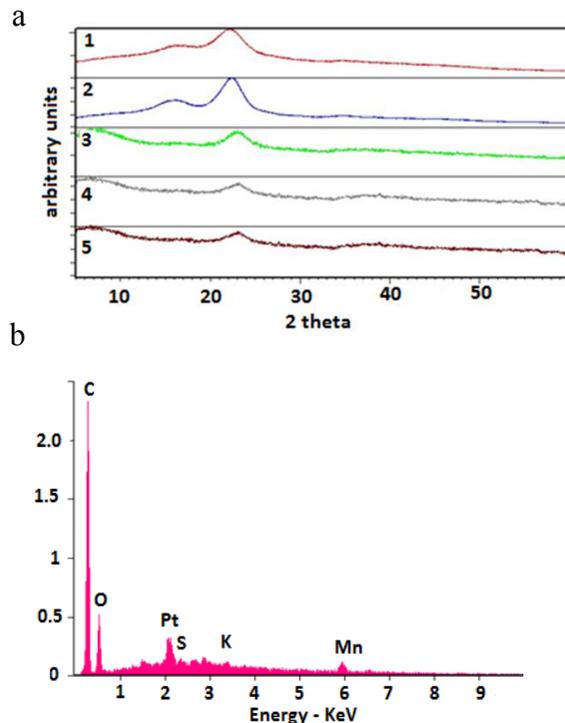


Figure 2. a) XRD spectra for: 1. WH dried grounded biomass; 2. PT2; 3. MnO₂-NP-WH sample 1; 4. MnO₂-NP-WH sample 3; 5. MnO₂-NP-WH sample 2. b) EDS analysis of MnO₂-NP-WH sample 1 surface

Moreover, the XRD patterns showed no further visible changes and no peak corresponding to MnO₂, even for the bionanocomposites MnO₂-NP-WH synthesized under different conditions. This might be attributed to the presence of very small crystals, which are apparently below the detection limit of XRD or might be due to the amorphous nature of the MnO₂ prepared (9). The EDX analysis of bionanocomposite MnO₂-NP-WH-sample 1 (Figure 2b) showed the characteristic signal for Mn at 5.92 eV. These XRD and EDX results coincide with previously reported studies of MnO₂ NPs synthesized under similar experimental conditions (1, 20, 27). The EDX spectrum also showed a signal of Pt around 2.10 eV, which corresponds to the Pt coating used for the analysis.

The scanning electron micrographs of MnO₂-NP-WH-sample 1 exhibited a surface texture, porosity, and cavities of high irregularity (Figure 3a) with elongated hollows of 1-3 μm (Figure 3b), in which the deposition of spherical agglomerated MnO₂ NPs occurred (Figure 3c). All these in agreement with previous reports of MnO₂ NPs (26).

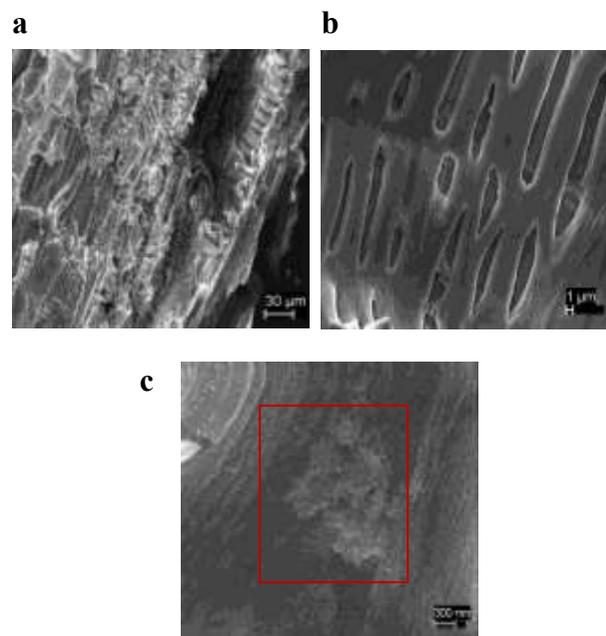


Figure 3. SEM images of MnO₂-NP-WH sample 1 at a) 30 μm , b) 1 μm , c) 300 nm

Dye degradation experiments and MnO₂-NP-WH catalyst reuse

For each degradation test, the variation of the dye concentration was monitored measuring the UV-Vis absorbance at $\lambda = 600 \text{ nm}$, using a pre-established calibration curve. The amount of dye absorbed (q) at any time t was calculated from equation [2].

$$q_t = \frac{V(C_o - C_t)}{W} \quad [2]$$

Where, at equilibrium e , $q_t = q_e$ and $C_t = C_e$. And C_o , C_t and C_e are the initial, any time, and equilibrium concentrations of the dye solutions (mg/L), respectively. V is the solution volume and W is the mass of adsorbent (28). The dye removal percentage [Re(%)] was calculated as follows:

$$\text{Re}(\%) = \frac{(C_o - C_t) \cdot 100}{C_o} \quad [3]$$

Prior to the degradation experiments, the catalyst was placed in a small sealed paper bag (similar to a tea bag) in order to prevent the MnO₂-NP-WH catalyst diffusion in the solution, facilitate the catalyst withdrawn process, and to slightly approach the experimental set up to an industrial design (Figure 4a).

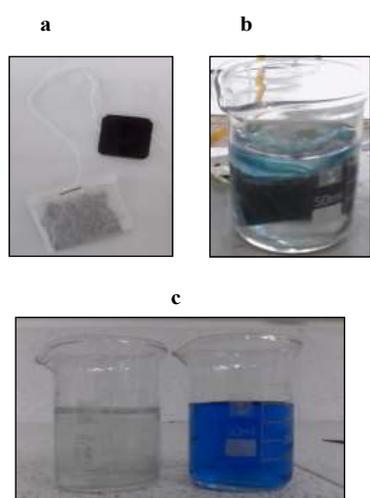


Figure 4. a) Paper bag with MnO₂-NP-WH inside b) Experimental set-up c) Color change of the solution before and after the contact with the MnO₂-NP-WH catalyst

The first degradation tests were conducted at pH 7 using 1.0 g of MnO₂-NP-WH catalyst in a 20 ppm solution of IC. No change in the initial dye concentration was observed during these attempts even after 2 h of contact. However, pH variations (2.3, 4.5 and 7.0) in additional experiments showed that the best results for IC removal were obtained at pH = 2.3 (Figure 4b-c). The IC removal efficiency comparison between the MnO₂-NP-WH catalyst synthesized (sample 1, 2 and 3) and the WH samples (Figure 5), showed that all nanobiocomposites had much better IC degradation rate than the non-modified WH, pretreated WH, and also to the activated carbon, evaluated as absorbent solid. It must be noted that MnO₂-NP-WH sample 2 is the fastest IC degradation catalyst, requiring only 5 min to achieve the 97.6% dye removal. For the same degradation results, the activated carbon needed more than 50 min.

This removal effectiveness at lower pH conditions is favored by the presence of -SO₃⁻ groups over the IC structure (27). As a consequence, at acidic conditions, the MnO₂-NP-WH bionanocomposite surface is protonated, increasing the electrostatic interactions with the IC molecules as well as the degradation rate.

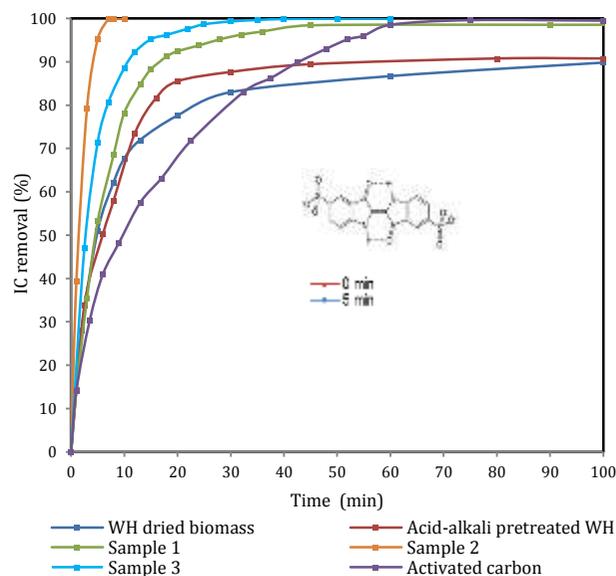


Figure 5. Dye removal at 22°C and pH = 2.3. Insert: UV-Vis monitoring of IC color removal

To support the above hypothesis, the pH_{pzc} of the biocomposite was determined. The point of zero charge (pzc) describes the condition when the electrical charge on a surface is zero and it is frequently determined in relation to an electrolyte's pH. In other words, pH_{pzc} is usually the pH value at which a solid submerged in an electrolyte exhibits zero net electrical charge on the surface (29). Therefore, in NP synthesis, cations adsorption is favored at $\text{pH} > \text{pH}_{\text{pzc}}$, while the anions adsorption is favored at $\text{pH} < \text{pH}_{\text{pzc}}$ (30). For the WH biomass a value of $\text{pH}_{\text{pzc}} = 4.5$ was obtained, which means that WH surface is positive charged at $\text{pH} < 4.5$. Then, there is a strong electrostatic interaction between the WH surface and the IC molecules at low pHs, promoting the dye adsorption and degradation. Similarly, other studies reveal the high dependence of the MnO₂ surface on the pH solution, in those a pH_{pzc} value between 4-5 was determined as optimal (20, 31).

The temperature effect on IC degradation was tested for MnO₂-NP-WH sample 2 at pH = 2.3. The results show that the bionanocomposite performs better at low temperatures (Figure 6), which is a positive variable in the case of scaling up experiments. The physicochemical explanation and implications of these results are under studying at moment by this group.

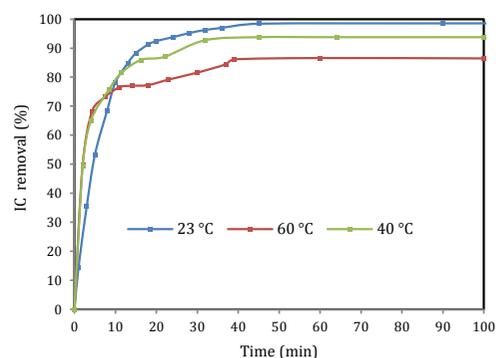


Figure 6. IC removal in time by varying temperature at pH ~ 2.3 for sample 2

To measure the reuse capacity of the MnO₂-NP-WH catalysts, sachets with 0.5 g of bionanocomposite were sequentially placed into seven different IC fresh prepared solutions; the characteristic absorption in each solution was followed by UV-Vis after 5 min contact (Figure 7). The results showed that the degradation capacity for the untreated WH was just 30% of the initial after seven cycles of usage. Meanwhile, by comparing the last cycle with the initial for MnO₂-NP-WH samples 1 and 3, the degradation capacity was lightly reduced in just 5 and 3%, respectively. Interestingly, the dye removal of MnO₂-NP-WH sample 2 decreased abruptly after the sixth cycle of usage. The possible reasons for these variations in reuse capacity are: (i) occupation of available adsorption sites within the WH matrix by IC molecules and (ii) leaching of MnO₂ NPs to the solution, reducing the number of active reaction sites on the bionanocomposite surface.

In order to characterize the IC degradation products, the solution, before and after IC color removal process, was monitored by ESI-MS in negative ion mode. Similar to what was reported by Combariza *et al.* (20), the ESI-MS for the initial IC solution presented a unique and characteristic base peak at *m/z* 421, corresponding to IC in its anionic form (32). After 5 min of degradation, there was no signal for IC, instead, several peaks were shown at *m/z* 190, 226, 237, 253 and 257.9 (Figure 8). Among these signals, the peak at *m/z* 226 has been previously assigned to the oxidative breaking of the initial C=C bond and it have been identified as isatin sulfonic acid (20, 32-34).

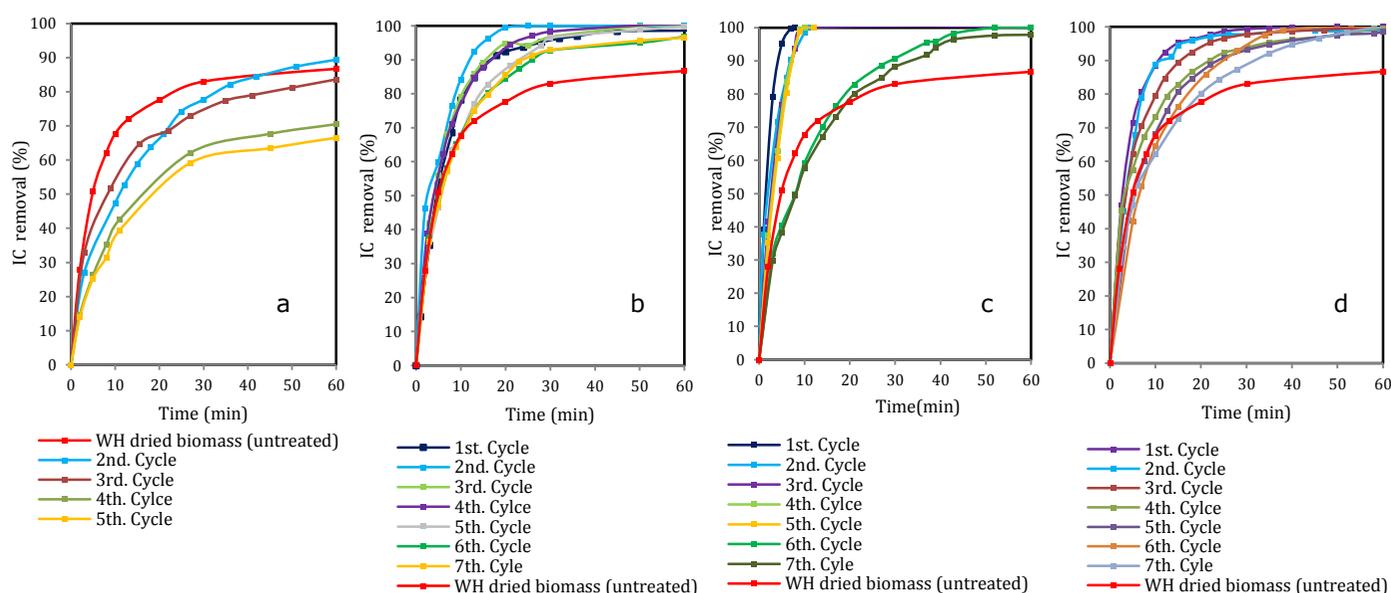


Figure 7. IC removal ($T = 22^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 2.3$) after consecutive reuse cycles. **a)** WH untreated; **b)** MnO₂-NP-WH sample 1; **c)** MnO₂-NP-WH sample 2; **d)** MnO₂-NP-WH sample 3

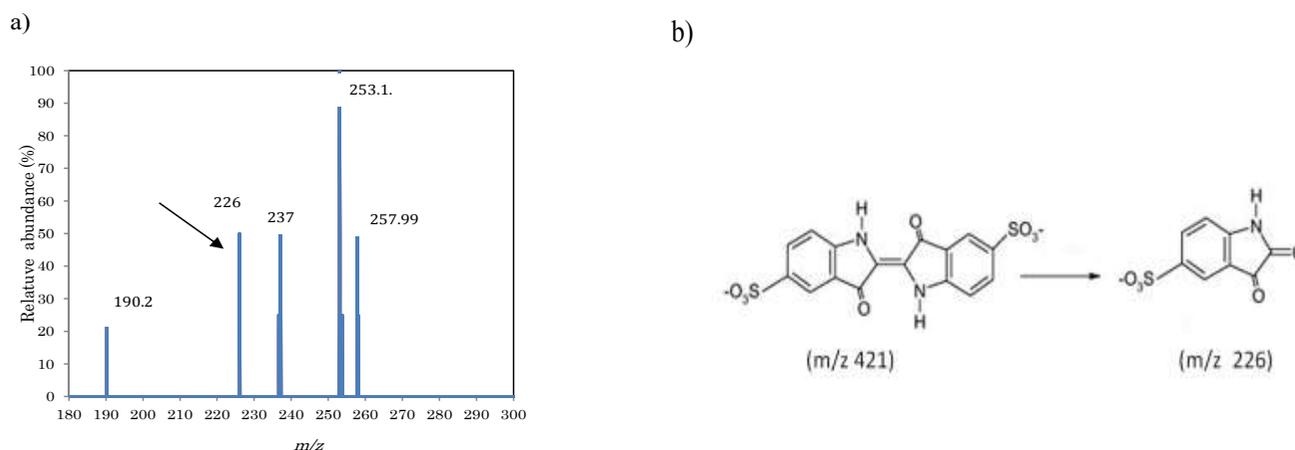


Figure 8. a) ESI-MS after a reaction time of 5 min; **b)** Indigo carmine (*m/z* 421) and isatin sulfonic acid (*m/z* 226), one of the few degradation products identified

Conclusions

The water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) has a great potential as solid matrix for the deposition of MnO₂ NPs and as catalyst in the organic dyes degradation, due to its surface morphology and high adsorbent capacity. It is therefore an economic and practical alternative for the solution of two current environmental issues: (i) water contamination, due to the extensive withdrawal of toxic dyes such as IC, and (ii) the invasion of water reservoirs caused by the WH extremely fast proliferation and growth, which presents serious environmental, economic, and navigation challenges, among others.

The NPs synthetic methods studied in this investigation, ethanol and ultrasonic-assisted, both provided suitable conditions for the deposition of MnO₂ NPs over cellulosic matrices under the described experimental parameters. It was found that the ethanol-assisted synthesis produces the highest deposition of manganese onto the pretreated WH (33.3%) in comparison with the ultrasonic bath (28.7%) and horn-assisted (21.7%) synthesis. However, the leaching of MnO₂ particles is considerable lower after the ultrasonic synthesis and the catalyst reuse produces therefore better results by this synthetic methodology.

The results showed that the MnO₂-NP-WH bionanocomposites constitute effective catalysts for the IC degradation in aqueous solution at 23 °C, pH = 2.3 and 5 min contact time. Under these conditions, 97.6% of IC can be degraded (percentage as function of decrease in absorbance at the λ_{\max} for IC). Finally, the mass spectrometry analysis evidenced that although some pure absorption processes by the WH matrix cannot be ruled out, a chemical degradation of the dye was confirmed.

References

- Saha, S.; Pal, A. Microporous assembly of MnO₂ nanosheets for malachite green degradation. *Sep. and Purif. Technol.* **2014**, *134*, 26-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2014.07.021>.
- Priya, E. S.; Selvan, P. S. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) – An efficient and economic adsorbent for textile effluent treatment-A review. *Arabian J. Chem.* **2014**. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.03.002>.
- Vautier, M.; Guillard, C.; Herrmann, J. M. Photocatalytic Degradation of Dyes in Water: Case Study of Indigo and of Indigo Carmine. *J. Catal.* **2001**, *201* (1), 46-59. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/jcat.2001.3232>.
- Palma, R. E.; Macías, J.; González, I.; Torres, R. A. Tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria textil mediante oxidación electroquímica. *Rev. Colomb. Mater.* **2013**, *4*, 93-108.
- Barka, N.; Assabbane, A.; Nounah, A.; Ichou, Y. A. Photocatalytic degradation of indigo carmine in aqueous solution by TiO₂-coated non-woven fibres. *J. Hazard. Mater.* **2008**, *152* (3), 1054-1059. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.080>.
- Rauf, M. A.; Ashraf, S. S. Radiation induced degradation of dyes—An overview. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *166* (1), 6-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.11.043>.
- Ahmed, K. A. M.; Peng, H.; Wu, K.; Huang, K. Hydrothermal preparation of nanostructured manganese oxides (MnO_x) and their electrochemical and photocatalytic properties. *Chem. Eng. J. (Amsterdam, Neth.)* **2011**, *172* (1), 531-539. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2011.05.070>.
- Yu, C.; Li, G.; Wei, L.; Fan, Q.; Shu, Q.; Yu, J. C. Fabrication, characterization of β -MnO₂ microrod catalysts and their performance in rapid degradation of dyes of high concentration. *Catal. Today* **2014**, *224* (0), 154-162. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2013.11.029>.
- Maliyekkal Shihabudheen, M.; Kinattukara Lisha, P.; Pradeep, T. A novel cellulose-manganese oxide hybrid material by in situ soft chemical synthesis and its application for the removal of Pb(II) from water. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *181*, 986-995. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.05.112>.
- Zhang, W.; Yang, Z.; Wang, X.; Zhang, Y.; Wen, X.; Yang, S. Large-scale synthesis of β -MnO₂ nanorods and their rapid and efficient catalytic oxidation of methylene blue dye. *Catal. Commun.* **2006**, *7* (6), 408-412. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.catcom.2005.12.008>.
- Sui, N.; Duan, Y.; Jiao, X.; Chen, D. Large-Scale Preparation and Catalytic Properties of One-Dimensional α/β -MnO₂ Nanostructures. *J. Phys. Chem. C.* **2009**, *113* (20), 8560-8565. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jp810452k>.
- Invasive Species Compendium, Datasheet *Eichhornia crassipes*. <https://www.invasivespeciesinfo.gov/aquatics/waterhyacinth.shtml> (accessed November 1st 2015).
- Télliez, T. R.; López, E. M. D. R.; Granado, G. L.; Pérez, E. A.; López, R. M.; Guzmán, J. M. S. The water hyacinth, *Eichhornia crassipes*: an invasive plant in the Guadiana River Basin (Spain). *Aquatic Invasions* **2008**, *3* (1), 42-53. DOI: <http://dx.doi.org/10.3391/ai.2008.3.1.8>.
- Lin, S.; Wnag, G.; Na, Z.; Lu, D.; Liu, Z. Long-root *Eichhornia crassipes* as a biodegradable adsorbent for aqueous As (III) and As (V). *Chem. Eng. J.* **2012**, *183*, 365-371. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.01.013>.
- Komy, Z. R.; Abdelraheem, W. H.; Ismail, N. Biosorption of Cu²⁺ by *Eichhornia crassipes*: Physicochemical characterization, biosorption modeling and mechanism. *J. King Saud. Univ. Sci.* **2013**, *25*, 47-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2012.04.002>.
- Zheng, J. C.; Feng, H. M.; Lam, M. H.W.; Lam, P. K.S. Removal of Cu(II) in aqueous media by biosorption using water hyacinth roots as a biosorbent material. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *171*, 780-785. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.078>.
- National Environment Protection Council NEPC Schedule B3: Guideline on Laboratory Analysis of Potentially Contaminated Soils, 2011. <http://goo.gl/g0uQz4> (accessed December 12 2015).
- Wang, H.; Zheng, M.; Chen, J.; Ji, G.; Cao, J. M. Synthesis of MnO₂ Microfiber with Secondary Nanostructure by Cotton Template. *J. Nanotech.* **2010**, *2010*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/479172>.
- Zhu, S.; Zhang, D.; Li, Z.; Furukawa, H.; Chen, Z. Precision Replication of Hierarchical Biological Structures by Metal Oxides Using a Sonochemical Method. *Langmuir* **2008**, *24*, 6292-6299. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/la7037153>.
- Chacón Patiño, M. L.; Blanco Tirado, C.; Hinestroza, J. P.; Combariza, M. Y. Biocomposite of nanostructured MnO₂ and fique fibers for efficient dye degradation. *Green Chem.* **2013**, *15*, 2920-2928. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C3GC40911B>.

21. Kumar, P.; Barrett, D. M.; Delwiche, M. J.; Stroeve, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production University of California. *Division of Agriculture and Natural Resources* [Online], 2009. <http://ucanr.edu/datastoreFiles/234-1388.pdf> (accessed August 26th 2015).
22. Esteghlalian, A.; Hashimoto, A. G.; Fenske, J. J.; Penner, M. H. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresour. Tech.* **1997**, *59* (2-3), 129-136. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)81606-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(97)81606-9).
23. Ganguly, A.; Das, S.; Bhattacharya, A.; Dey, A.; Chatterjee, P. K. Enzymatic hydrolysis of water hyacinth biomass for the production of ethanol. Optimization of giving parameters. *Indian J. Exp. Biol.* **2013**, *51*, 556-566.
24. Agbor, V. B.; Cicek, N.; Sparling, R. Biomass pretreatment: Fundamentals toward applicaton. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 675-685. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>.
25. Subramanian, V.; Zhu, H.; Wei, B. Alcohol-assisted room temperature synthesis of different nanostructured manganese oxides and their pseudocapacitance properties in neutral electrolyte. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *453*, 242-249. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2008.01.042>.
26. Chacón, M.L. Síntesis *in situ* y caracterización de nanopartículas de óxidos de manganeso en fibras de fique y su aplicación en el tratamiento de agua contaminada con colorantes. MSc. Thesis, UIS, Bucaramanga, 2011.
27. Al-Degs, Y. S.; El-Barghouthi, M. I.; El-Sheikh, A. H.; Walker, G. M. Effect of solution pH, ionic strength, and temperature on adsorption behavior of reactive dyes on activated carbon. *Dyes Pigm.* **2008**, *77* (1), 16-23. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2007.03.001>.
28. Elmorsi, T., Equilibrium Isotherms and Kinetic Studies of Removal of Methylene Blue Dye by Adsorption onto Miswak Leaves as a Natural Adsorbent. *J. Environ. Protection* **2011**, *2*, 817-827.
29. Singha, S.; Sarkar, U.; Mondal, S.; Saha, S. Transient behavior of a packed column of Eichhornia crassipes stem for the removal of hexavalent chromium. *Desalination* **2012**, *297* (0), 48-58. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2012.04.016>.
30. Lakshmi, U. R.; Srivastava, V. C.; Mall, I. D.; Lataye, D. H. Rice husk ash as an effective adsorbent: Evaluation of adsorptive characteristics for Indigo Carmine dye. *J. Environ. Manage.* **2009**, *90* (2), 710-720. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.01.002>.
31. Grządka, E. The Adsorption Layer in the System: Carboxymethylcellulose/Surfactants/NaCl/MnO₂. *J. Surfact. Deterg.* **2012**, *15* (4), 513-521. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007%2Fs11743-012-1340-5>.
32. Dalmázio, I.; de Urzedo, A. P.; Alves, T.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N.; Nascentes, C. C. *et al.* Electrospray ionization mass spectrometry monitoring of indigo carmine degradation by advanced oxidative processes. *J. mass spectrom.* **2007**, *42* (10), 1273-1278. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jms.1159>.
33. Coelho M.G. ; Lima G.M.; Augusti, R.; Maria, D.A.; Ardisson, J.D. New materials for photocatalytic degradation of Indigo Carmine— Synthesis, characterization and catalytic experiments of nanometric tin dioxide-based composites. *Appl. Catal. B: Environ.* **2010**, *96*, 67-71. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.02.002>.
34. Zaided, M.; Peulon, S.; Bellakhal, N.; Desmazieres, B.; Chaussé, A. Studies of N-demethylation oxidative and degradation of methylene blue by thin layers of birnessite electrodeposited onto SnO₂. *Appl. Catal. B: Environ.* **2011**, *101* (3), 441-450. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.10.014>.

Article citation:

Cuervo-Blanco, T.; Sierra, C. A.; Zea, H. R. Nanostructured MnO₂ catalyst in *E. crassipes* (water hyacinth) for indigo carmine degradation. *Rev. Colomb. Quim.* **2016**, *45* (2), 30-38. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.60395>.



Paola M. Figueroa¹, Miguel A. Ceballos¹, Andrés M. Hurtado^{2,*}

¹ Grupo de investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA) - Universidad de Nariño.
Ciudad Universitaria Torobajo, Pasto - Calle 18 Cr 50

² Director grupo de investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria - Universidad de Nariño, Facultad de Ingeniería Agroindustrial.
Ciudad Universitaria Torobajo - Calle 18 Cr 50.

*Autor para correspondencia: ahurtadob@hotmail.com

Recibido: 17 de Mayo de 2016. Aceptado: 18 de Agosto de 2016.

Microencapsulación mediante secado por aspersión de aceite de mora (*Rubus glaucus*) extraído con CO₂ supercrítico

Resumen

El aceite de mora es un ingrediente natural con potencial en la industria cosmética y alimentaria, puede experimentar degradación oxidativa en condiciones ambientales. Se extrajo aceite a partir de semillas de mora empleando fluidos supercríticos, se microencapsuló mediante secado por aspersión y se evaluó la influencia de diferentes condiciones de operación en el rendimiento y la eficiencia del proceso. Se emplearon como materiales encapsulantes: masterdry, goma arábica y maltodextrina. Se comparó el perfil de ácidos grasos antes y después de la microencapsulación y se estudió el tamaño y morfología de las microcápsulas. En el proceso de microencapsulación la temperatura de entrada fue la única variable estadísticamente significativa usando masterdry y goma arábica. La goma arábica resultó ser el mejor encapsulante entre los tres estudiados. Se obtuvieron microcápsulas con tamaños entre 8,2 y 14 µm, con superficie continua en las paredes y ausencia de poros. Se comprobó que la microencapsulación con los tres encapsulantes permitió proteger el aceite y conservar mayoritariamente su perfil de ácidos grasos.

Palabras clave: semilla de mora, fluidos supercríticos, microencapsulación, microscopia electrónica de barrido.

Microencapsulation by spray drying of blackberry (*Rubus glaucus*) oil extracted with supercritical CO₂

Abstract

Blackberry oil is a natural ingredient with potential in cosmetics and food industry, however, it experiences oxidative degradation at ambient conditions. Therefore, oil was obtained from blackberry seeds by supercritical fluid extraction and then was microcapsulated by spray drying. The influence of different operating conditions during spray-drying towards yield and encapsulation was evaluated. Masterdry, gum arabic, and maltodextrin were used as wall materials. Fatty acid profile was compared before and after microencapsulation, the size and morphology of the microcapsules were also studied. Inlet temperature was the only statistically significant variable in process yield and efficiency when gum arabic and masterdry were used. Feed flow rate was statistically significant only for process yield and it was influenced negatively when maltodextrin was used. Gum arabic was the best wall material among the three studied. Microcapsules with sizes between 8.2 and 14 µm were obtained; continuous wall and no apparent cracks were observed. It was also seen that the fatty acid profile was mostly conserved after microencapsulation process carried out with the three wall materials.

Keywords: blackberry seed, supercritical fluids, microencapsulation, scanning electron microscopy.

Microencapsulação por secagem por atomização de óleo de amora (*Rubus glaucus*) extraído com CO₂ supercrítico

Resumo

O óleo de amora é um ingrediente natural com potencial na indústria cosmética e dos alimentos, é susceptível à degradação por oxidação em condições ambientais. O óleo de sementes de amora foi extraído usando fluidos supercríticos e foi microencapsulado por secagem por pulverização. Foi avaliada a influência de diferentes condições de operação sobre o rendimento e eficiência do processo. Foram utilizados como materiais de encapsulação: masterdry, maltodextrina, e goma arábica. O perfil dos ácidos graxos foi comparado antes e depois de microencapsulação, o tamanho e a morfologia das microcápsulas foi também estudada. Determinou-se que, no processo de microencapsulação a temperatura de entrada era a única variável estatisticamente significativa usando masterdry e goma arábica. A goma-arábica mostrou ser o melhor encapsulante entre os três estudados. Foram obtidas microcápsulas com tamanhos entre 8,2 e 14 µm, superfície contínua sobre as paredes e ausência de poros. Verificou-se que a microencapsulação permitiu que os três encapsulantes protegessem o óleo e retivessem majoritariamente o seu perfil de ácidos graxos.

Palavras-Chave: semente de amora, fluidos supercríticos, microencapsulação, microscopia eletrônica de varredura.

Introducción

En Colombia, la mora es una fruta muy apetecida para elaboración de productos como mermeladas, pulpas, conservas, entre otros (1). Se estima que en los últimos años la industria ha consumido aproximadamente 10000 toneladas por año. El procesamiento de mora está ligado a la generación de cantidades considerables de residuos que son dispuestos por las empresas como desechos y producen un impacto negativo al ambiente (2). Una forma de mitigar este impacto y dar valor agregado a estos desechos es generar subproductos que puedan ser usados en la industria cosmética y alimentaria, como por ejemplo el aceite obtenido de la semilla.

Los aceites pueden ser aislados mediante la tecnología de extracción con fluidos supercríticos (SFE) que tiene grandes ventajas: es selectiva, requiere menor tiempo, consume menos energía que otras y es limpia en términos ecológicos (3). Desafortunadamente, una vez extraídos, los aceites experimentan reacciones que conducen a la degradación oxidativa, por ello es necesario implementar técnicas que permitan conservar sus propiedades. La microencapsulación es una alternativa factible que permite la protección de compuestos bioactivos y su liberación controlada, aumentando la vida útil del producto (4).

El secado por aspersión es un método de microencapsulación ampliamente utilizado en la industria que consiste en la dispersión de la sustancia a encapsular en el agente encapsulante, seguido de una atomización de la muestra en una cámara a alta temperatura (5); el solvente se evapora instantáneamente y el material activo queda atrapado dentro de una película de material encapsulante (6).

En varios estudios (7-9) se ha concluido que el secado por atomización es adecuado para compuestos sensibles a altas temperaturas, proporciona buena estabilidad del producto final, requiere bajos costos de procesamiento y es fácil de implementar. Por ejemplo, en Rendón *et al.* (10), se estudió la estabilidad oxidativa de aceite de linaza microencapsulado y se comprobó que aplicando esta técnica existe una menor velocidad de degradación de los lípidos, concordando con los resultados obtenidos por Partanen *et al.* (11). De la misma forma, en Frascareli *et al.* (12) se microencapsuló aceite de café y se confirmó su eficacia en la protección contra la oxidación de lípidos, obteniendo resultados similares a Bae y Lee (13) con el aceite de aguacate.

Por otra parte, algunos autores (14, 15) se han interesado en microencapsular compuestos, pigmentos o extractos obtenidos a partir del fruto de la mora, obteniendo resultados favorables en cuanto a conservación y estabilidad. Sin embargo, dado que hasta el momento no se ha estudiado la microencapsulación de aceite de semillas de mora, el objetivo de esta investigación fue desarrollar un proceso de conservación de aceite de mora (*Rubus glaucus*) mediante microencapsulación por secado por aspersión y determinar la influencia de diferentes condiciones de operación en el rendimiento y la eficiencia del proceso, utilizando diferentes materiales encapsulantes: masterdry, goma arábica y maltodextrina. Adicionalmente se evaluó el tamaño y morfología de las microcápsulas obtenidas.

Materiales y métodos

Materiales

Las semillas de mora (*Rubus glaucus*) fueron suministradas por la industria de procesos agroindustriales de Nariño (INPADENA). Inicialmente se realizó el acondicionamiento de las semillas retirando el exceso de pulpa. Seguidamente las semillas se secaron a 50 °C por 12 h en un secador de bandejas, se molieron y se empaquetaron al vacío. Como disolvente para la extracción con fluidos supercríticos se utilizó dióxido de carbono con una pureza del 99,8% v/v (Cryogas S.A., Colombia). Los materiales encapsulantes fueron goma arábica master gum FT 1873-01 (Tecnas S.A.-Colombia), maltodextrina 18-22 (Tecnas S.A.-Colombia) y masterdry 13631-02 (mezcla de almidones modificados y goma arábica prehidratada (Tecnas S.A.-Colombia)).

Los solventes utilizados para determinar la eficiencia del proceso de microencapsulación fueron: éter etílico (99,7% v/v, Panreac, España), Éter de Petróleo (40-60°C pure, Panreac, España), etanol (91% v/v, Fisher Scientific, USA), hexano (95% v/v, Panreac, España) y ácido clorhídrico (37% p/p, Panreac, España). Se empleó como emulgente Tween® 20 (Panreac, España).

Extracción con fluidos supercríticos

La extracción de aceite de semillas de mora se realizó en un equipo SFE 500 (Waters, USA). Para ello se colocaron 250 g de semillas molidas de mora en la celda de extracción, seguidamente se hizo pasar el CO₂ empleando una bomba de desplazamiento positivo de alta presión, modelo P-50 (Thar, USA) hasta alcanzar 35 MPa. La temperatura dentro del recipiente se elevó y se mantuvo a 60 °C con una camisa de calefacción que envolvió el recipiente. Una vez alcanzadas las condiciones de operación (presión y temperatura) en la columna de extracción, se inició el proceso ajustando el flujo de CO₂ a 30 g/min por un tiempo de 150 min. Finalmente, se despresurizó el equipo, el CO₂ en estado gaseoso circuló hasta el escape y el aceite extraído se recogió en un vial ámbar.

Preparación de las emulsiones

Se prepararon emulsiones aceite en agua (O/W por sus siglas en inglés) con 30% p/p de sólidos de acuerdo al método descrito por Tuyen *et al.* (16), con algunas modificaciones. Para ello, se usaron masterdry, goma arábica y maltodextrina como materiales encapsulantes. Se calentaron 35 g de agua destilada a 40 °C y como emulgente se adicionó 0,5 mL de Tween® 20. Lentamente se agregaron 12,5 g de goma arábica o maltodextrina (en cada caso) y luego se incorporaron 2,5 g de aceite de mora; durante todo el procedimiento la mezcla se mantuvo en agitación magnética. Se homogenizó durante dos min a 30000 rpm, empleando un homogenizador *home made* tipo ultraturrax, fabricado con un motor de alta velocidad modelo 3000N/10 (Dremel, USA). Para realizar la emulsión con masterdry, se realizó el mismo procedimiento pero con agua a temperatura de 20 °C.

Microencapsulación de aceite de mora

La microencapsulación del aceite de mora se llevó a cabo empleando un secador spray BILON-6000Y (Shanghai, China), de acuerdo al método descrito por Tonon et al. (17). Inicialmente, se pre-calentó la cámara de secado para garantizar que la temperatura en toda la cámara fuera uniforme. Se variaron las condiciones de proceso para cada prueba como se indica en la Tabla 1. Se alimentaron las emulsiones al equipo por medio de una bomba peristáltica y el caudal de alimentación se controló por la velocidad de rotación de la bomba. Las microcápsulas obtenidas se almacenaron a 3 °C por tres meses en viales ámbar para su posterior análisis.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre tratamientos se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de rangos múltiples de Tukey utilizando el software Statgraphics® Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Se utilizó un diseño experimental factorial 2³ con cuatro puntos centrales, para un total de 12 experimentos por cada encapsulante (Tabla 1). Los ensayos se realizaron de manera aleatoria y con cuatro réplicas en el punto central.

Tabla 1. Diseño factorial de experimentos 2³ para el proceso de secado por aspersión.

Experimento	Temperatura (°C)	Caudal emulsión (mL/min)	Velocidad del aire (m/s)
1	150	5	8
2	200	5	8
3	150	15	8
4	200	15	8
5	150	5	11
6	200	5	11
7	150	15	11
8	200	15	11
9	175	10	9,5
10	175	10	9,5
11	175	10	9,5
12	175	10	9,5

Rendimiento de la microencapsulación (EY)

El rendimiento fue calculado como la relación entre el contenido de sólidos totales en el polvo resultante y el total de contenido de sólidos en la mezcla de alimentación expresado como porcentaje (16, 18), mediante la ecuación [1]:

$$EY (\%) = \frac{W_m}{W_0} \times 100 \quad [1]$$

Donde: *EY* = rendimiento de la microencapsulación en porcentaje de masa, *W_m* = peso total de microcápsulas obtenido (g) y *W₀* = sólidos totales de entrada en la emulsión (g)

Eficiencia de la microencapsulación (EE)

La eficiencia fue calculada con base en el aceite de mora retenido dentro de las microcápsulas mediante la ecuación [2]:

$$EE (\%) = \frac{AT-AS}{AT} \times 100 \quad [2]$$

Donde: *EE* = eficiencia de la microencapsulación en porcentaje en masa, *AT* = aceite total presente en las microcápsulas (g) y *AS* = aceite superficial presente en las microcápsulas (g).

El contenido total de aceite se cuantificó utilizando como referencia el método AOAC 922.06 (19), con algunas modificaciones. El método consiste en hidrólisis ácida, extracción con disolvente, recuperación del aceite por rotavapor y análisis gravimétrico.

Para ello se transfirieron 2 g de microcápsulas a un tubo de 50 mL, se añadieron 2 mL de etanol y se mezcló para humedecer todas las partículas. Luego se añadieron 10 mL de una solución de HCl (25 mL de HCl al 37 % p/p y 11 mL de agua grado HPLC), se puso el tubo en un baño de agua a 75 °C y se agitó a intervalos frecuentes durante 40 min. Se añadieron 10 mL de etanol y se enfrió. Se transfirió la mezcla a un embudo de decantación, se añadieron 25 mL de éter etílico en tres porciones y se agitó vigorosamente durante 1 min. Seguidamente se agregaron 25 mL de éter de petróleo de forma continua y se agitó durante 1 min. La mezcla de éter-grasa fue separada y filtrada a través de una compresa de algodón. Se extrajo nuevamente la solución restante en el embudo dos veces, cada vez con 10 mL de cada éter; luego se secó la mezcla en rotavapor a 40 °C. Finalmente, el aceite se secó en horno a una temperatura de 100 °C hasta obtener peso constante y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

El aceite superficial se determinó siguiendo el método empleado por Bae y Lee (13) con algunas modificaciones. Se pesaron 2 g de muestra en un tubo de vidrio con tapón de rosca y se añadieron 13 mL de hexano. El tubo se llevó a un agitador de vórtice durante 2 min para extraer el aceite libre, la mezcla se decantó y filtró usando papel filtro marca Munktell (grado 388, diámetro: 125 mm); el polvo se enjuagó tres veces con 20 mL de hexano. Por último, se recogió el polvo, se secó a temperatura ambiente para eliminar el solvente residual y se registró el peso final.

Estabilidad de los ácidos grasos de aceite de mora microencapsulado

Se determinó por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID), usando un sistema de la versión 3 Shimadzu GC-17A (Shimadzu, Kyoto, Japón), equipado con una columna DB-WAX (30 m x 0,25 mm I.D. y 0,25 μm df, J&W de Agilent Scientific, EE.UU.), un inyector split/splitless y un detector de ionización de llama (FID) (280 °C), siguiendo la metodología de Hurtado et al. (20).

Para este análisis se usó una muestra del aceite extraído con CO₂ supercrítico y se comparó con el aceite obtenido de la determinación de aceite total presente en las microcápsulas resultantes de los ensayos en los cuales se obtuvo los mejores valores para rendimiento y eficiencia de la microencapsulación. Los ácidos grasos se derivataron para obtener sus respectivos ésteres metílicos.

La separación se realizó de acuerdo con la siguiente programación de temperatura del horno: temperatura inicial 40 °C, se mantuvo durante 5 min y después se elevó a 250 °C en 5 °C/min. El volumen de inyección fue de 1,0 µl en modo split (relación 1:10), manteniendo la temperatura del inyector a 250 °C. Se empleó helio como gas portador con un caudal de 1 mL/min. Las velocidades de flujo de los gases de combustión (FID) fueron 300 mL/min y 30 mL/min para el aire y el hidrógeno, respectivamente.

La recolección y manipulación de datos se llevó a cabo usando el software Shimadzu Clase VPTM 4.3. La identificación de ácidos grasos se realizó empleando estándares de ésteres metílicos de ácidos grasos FAME's (Restek, Bellefonte, EE.UU.). La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de normalización relativa de área cromatográfica en términos porcentuales.

Morfología y el tamaño de las microcápsulas mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Se examinó la morfología y el tamaño de las microcápsulas con un microscopio electrónico de barrido VEGA3 SB (TESCAN, Republica Checa). Se realizó un proceso de suspensión de las microcápsulas empleando hexano como solvente; posteriormente, se realizó la fijación de cada muestra en un pin metálico. Las muestras fijadas fueron observadas usando SEM, funcionando a un voltaje de aceleración de 10, 7 y 5 kV. Las micrografías correspondientes fueron capturadas. El tamaño de partícula se determinó como el diámetro medio de Sauter (SMD = Sauter Mean Diameter = $D_{[3,2]}$) utilizando la ecuación [3].

$$D_{[3,2]} = \frac{\sum_{i=1}^n N_i D_{pi}^3}{\sum_{i=1}^n N_i D_{pi}^2} \quad [3]$$

Donde D_{pi} es diámetro promedio de las partículas, tomado como la media aritmética de los diámetros mayor y menor y N_i es el número de partículas de diámetro D_{pi} .

Resultados y Discusión

Rendimiento de la microencapsulación

En la Tabla 2 se presentan los datos de rendimiento del proceso de microencapsulación. Se obtuvieron rendimientos en el rango de 87,5 a 91,8 ± 0,6% para masterdry, 84,2 a 89,9 ± 1,2% para goma arábica y 86,4 a 90 ± 0,2% para maltodextrina. Los valores resaltados en negrilla corresponden a los resultados en los cuales se obtiene mayor rendimiento y eficiencia.

Mediante el análisis de varianza ($p < 0,05$) (Tabla 3), se encontró que, cuando se emplea masterdry y goma arábica, la temperatura de entrada del aire tiene un efecto significativo y afecta de manera positiva el rendimiento, como se observa en la Figura 1.

Tabla 2. Condiciones de operación, rendimiento (EY) y eficiencia (EE) de microencapsulación de aceite de mora con diferentes materiales de pared

Velocidad del aire (m/s)	Caudal (mL/min)	Temperatura de entrada (°C)	Masterdry		Goma arábica		Maltodextrina	
			EY (%)	EE (%)	EY (%)	EE (%)	EY (%)	EE (%)
8	5	150	89,1	82,6	84,2	71,0	89,5	67,2
8	5	200	90,5	68,8	89,5	68,3	89,2	48,2
8	15	150	87,5	78,1	85,1	79,2	86,4	69,0
8	15	200	90,0	50,4	89,8	42,2	88,5	56,5
11	5	150	88,1	75,9	89,9	81,3	89,3	59,3
11	5	200	91,8	53,3	89,2	67,7	90,0	70,0
11	15	150	89,3	70,8	85,9	73,8	87,0	62,8
11	15	200	91,5	60,8	89,8	62,9	88,2	49,9
9,5	10	175	90,1	58,0	85,9	75,5	89,9	42,1
9,5	10	175	90,7	57,3	87,6	74,7	89,9	43,3
9,5	10	175	90,1	57,5	88,7	74,0	89,7	40,1
9,5	10	175	89,3	56,7	87,1	74,9	89,5	41,4

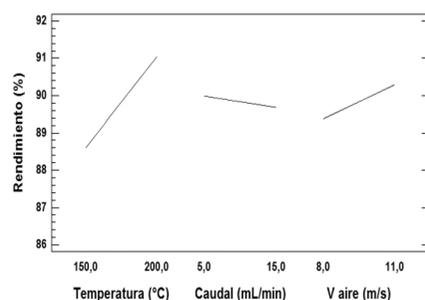
Por tanto, con el incremento de la temperatura, aumenta el rendimiento del proceso. Esto ocurre cuando, en el secado por atomización, se utilizan altas temperaturas de entrada, pues se produce mayor eficiencia en los procesos de transferencia de calor y de masa (17, 18). Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Cai *et al.* (21, 22), quienes trabajaron el secado por aspersión de betacianinas de *Amaranthus* y antocianinas de berenjena, respectivamente.

Tabla 3. Análisis de varianza para rendimiento (EY) y eficiencia (EE) de los tres encapsulantes estudiados. Valores estadísticamente significativos resaltados

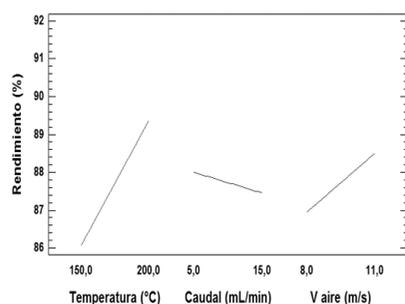
Fuente	Valor-P					
	Masterdry		Goma arábica		Maltodextrina	
	EY	EE	EY	EE	EY	EE
A: Temperatura	0,0031	0,0281	0,0155	0,0297	0,2328	0,4473
B: Caudal	0,5431	0,436	0,5743	0,2158	0,0339	0,8799
C: Vel. aire	0,1078	0,4662	0,1513	0,2938	0,7547	0,9796
AB	0,8365	0,9593	0,3247	0,1984	0,3361	0,6931
AC	0,3267	0,7284	0,1226	0,5078	0,9722	0,5057
BC	0,164	0,3441	0,2647	0,8033	0,9167	0,5426

Para maltodextrina, el caudal de alimentación de la emulsión afecta el rendimiento de manera negativa, como se observa en la Figura 1. Esto se debe a que, con una mayor tasa de alimentación, la transferencia de calor y masa es más lenta (17). Además, cuando se empleó alta velocidad de alimentación, se observaron aglomeraciones de microcápsulas en algunos sectores del equipo que no pueden ser recuperados, disminuyendo el rendimiento del proceso. En Toneli *et al.* (23) se estudió el secado por atomización de la inulina y se encontró que, con la disminución de la velocidad de la bomba, aumenta el rendimiento.

Gráfica de Efectos Principales para Rendimiento Masterdry



Gráfica de Efectos Principales para Rendimiento Goma Arábica



Gráfica de Efectos Principales para Rendimiento Maltodextrina

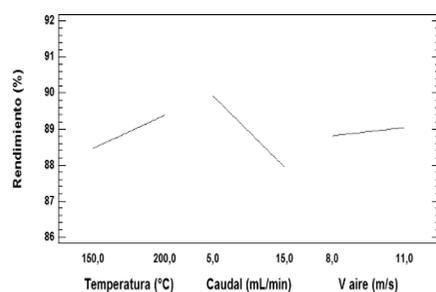
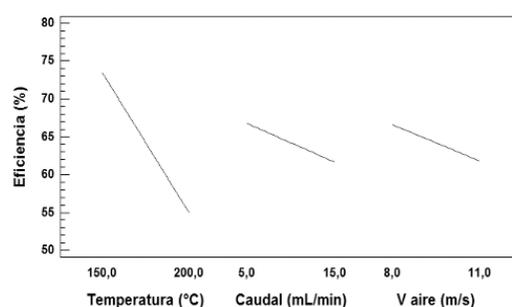


Figura 1. Efecto de las variables de proceso en el rendimiento de la microencapsulación

Eficiencia de la microencapsulación

Los resultados de la eficiencia de la microencapsulación se muestran en la Tabla 2. Se obtuvieron eficiencias en el rango de 50,4 a 82,6 \pm 0,5% para masterdry, 42,2 a 81,3 \pm 0,6% para goma arábica y 48,2 a 70 \pm 1,3% para maltodextrina. A partir del análisis de varianza (ANOVA) que se muestra en la Tabla 3, se observó que sólo la temperatura tuvo efecto significativo sobre la eficiencia cuando se utilizaron masterdry y goma arábica como encapsulantes. En el caso de la maltodextrina, ninguna variable fue estadísticamente significativa. Se encontró que la temperatura de entrada de aire influye de manera negativa en la eficiencia como se muestra en la Figura 2, es decir, a medida que se incrementa la temperatura, la eficiencia disminuye. Estos resultados son acordes con los obtenidos por Frascareli *et al.* (12), quienes estudiaron el efecto de las condiciones de proceso en la microencapsulación de aceite de café mediante secado por aspersión.

Gráfica de Efectos Principales para Eficiencia Masterdry



Gráfica de Efectos Principales para Eficiencia Goma Arábica

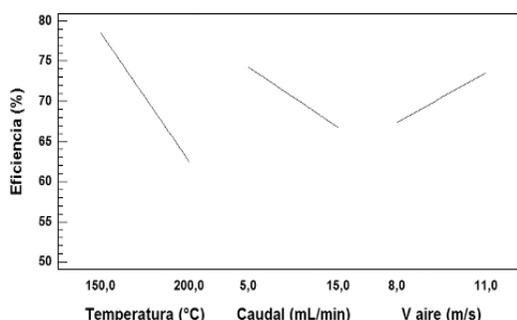


Figura 2. Efecto de las variables de proceso en la eficiencia de la microencapsulación usando goma arábica y masterdry como materiales de pared

Esta tendencia se presenta también en otros estudios de microencapsulación mediante secado por atomización (24, 25) donde se ha demostrado que a temperaturas entre 150 °C y 175 °C, se obtienen altas eficiencias. Esto se relaciona, específicamente, con el hecho de que, a elevadas temperaturas, se afecta el balance entre la velocidad de evaporación de agua y la formación de la película del material de pared, lo que lleva a la ruptura de la membrana formada (26). Las altas temperaturas del aire de entrada generan encapsulados con una capa delgada de recubrimiento que favorece la liberación adelantada y degradación del compuesto encapsulado, lo que se traduce en la disminución de la eficiencia de la microencapsulación. Debido a que el rendimiento y la eficiencia de la microencapsulación se vieron directamente afectados por la temperatura de entrada del aire, se determinó la combinación de los factores experimentales que simultáneamente maximizan el rendimiento y eficiencia mediante el análisis estadístico de optimización de múltiples respuestas; los resultados para cada material encapsulante se muestran resaltados en negrilla en la Tabla 2.

Estudio del efecto de diferentes materiales en la microencapsulación de aceite de mora

Dado que es importante considerar el efecto de las dos variables en el producto final, la comparación de los diferentes materiales encapsulantes se realizó utilizando el criterio de rendimiento por eficiencia (EY x EE), evaluado en los cuatro puntos centrales establecidos en el diseño experimental.

Con este propósito, se utilizó la prueba de rangos múltiples HSD de Tukey, basada en las medias de los tratamientos para rendimiento y eficiencia. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas con 95% de nivel de confianza. En la Figura 3 se observa que los mejores resultados se obtuvieron con goma arábica. Dichos resultados son similares a los obtenidos en el estudio realizado por Krishnan *et al.* (8) para la encapsulación de oleoresina de cardamomo, donde la goma arábica también exhibió mejor protección del material encapsulado que la maltodextrina y el almidón modificado HiCap100.

Los resultados obtenidos con la goma arábica en este estudio se deben a su capacidad para formar emulsiones estables con la mayoría de los aceites en un amplio intervalo de pH y formar una película viscoelástica visible en la interfase de aceite/agua (25). A su vez, sus características estructurales le confieren un carácter anfífilo lo que le permite adsorber en superficies lipofílicas y actuar como un coloide protector y, consecuentemente, como un buen agente formador de cápsulas y películas.

Por otro lado, el masterdry resultó ser mejor encapsulante que la maltodextrina en cuanto a efectividad de encapsulación. Este producto es un buen encapsulante debido a que en su composición se incluye una mezcla de almidones modificados de maíz y goma arábica. Por su parte, la maltodextrina exhibe una pobre capacidad emulsificante, baja estabilidad de la emulsión y baja retención de aceite (27), que da como resultado una baja eficiencia de encapsulación.

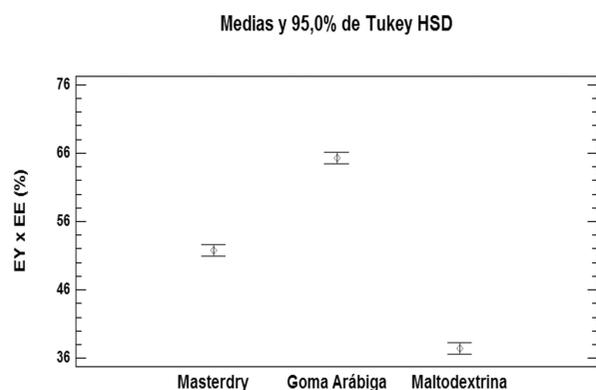


Figura 3. Prueba de rangos múltiples de Tukey HSD para rendimiento por eficiencia

Análisis y comparación de la composición del aceite de mora antes y después del proceso de microencapsulación

El perfil de ácidos grasos del aceite de mora se reporta en la Tabla 4. Se identificaron cinco ácidos grasos principales a partir del análisis cromatográfico del aceite de mora antes de ser encapsulado, entre ellos tres ácidos insaturados (linoleico, linoléico y oleico) y dos ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico), mencionados en orden de abundancia. Por otro lado, en todos los aceites encapsulados se observó una disminución en la cantidad de ácidos grasos insaturados y un aumento en los ácidos grasos saturados con respecto al aceite inicial sin encapsular, resultados acordes con los obtenidos en otras investigaciones (28-30).

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos del aceite de mora antes y después del proceso de microencapsulación con diferentes materiales de pared

Ácidos grasos identificados	Perfil de ácidos grasos del aceite de mora (Porcentaje de área relativa, %)			
	Aceite de mora sin encapsular	Encapsulado masterdry	Encapsulado goma arábica	Encapsulado maltodextrina
Palmítico (C16:0)	4,5	6,1	7,23	8,62
Esteárico (C18:0)	2,04	4,7	2,56	4,39
Oleico (C18:1)	8,11	8,7	7,09	6,26
Linoleico (C18:2)	52,88	50,5	51,88	53,51
Linoléico (C18:3)	32,47	30,1	31,24	27,22
SFA	6,54	10,8	9,79	13,01
MUFA	8,11	8,7	7,09	6,26
PUFA	85,35	80,6	83,12	80,73

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

En Calvo *et al.* (31) se afirma que el grado de insaturación de los ácidos grasos afecta de manera negativa la estabilidad de los aceites. Por lo anterior, se puede inferir que el aceite de mora tiende a degradarse con facilidad en condiciones ambientales, dado que en la muestra de aceite sin encapsular los ácidos grasos mayoritarios fueron los poliinsaturados (85,35%). Sin embargo, en los aceites obtenidos a partir de los encapsulados de masterdry, goma arábica y maltodextrina, la degradación es mínima, considerando que las microcápsulas se almacenaron por tres meses; se puede afirmar entonces que el proceso de microencapsulación fue efectivo manteniendo el perfil de ácidos grasos.

Entre los aceites encapsulados, se encontró que el perfil de ácidos grasos de aceite de mora se conserva mejor cuando se emplea goma arábica como material de pared, lo cual puede atribuirse a la naturaleza del encapsulante y la eficiencia de encapsulación obtenida, mencionada anteriormente.

Evaluación del tamaño y la morfología de las microcápsulas obtenidas

El tamaño de las microcápsulas obtenidas se reporta en la Tabla 5. En López *et al.* (30) se afirma que en equipos de secado por aspersión, a escala de laboratorio, el intervalo que se reporta para el diámetro medio de Sauter $D_{[3,2]}$ de las microcápsulas producidas es de 5 a 20 μm . Lo anterior es acorde a los resultados obtenidos en la presente investigación.

Tabla 5. Diámetro medio de Sauter $D_{[3,2]}$ de las microcápsulas

Material Encapsulante	Diámetro medio de Sauter $D_{[3,2]}$ (μm)
Masterdry	$8,2 \pm 0,30$
Goma Arábica	$11,8 \pm 0,35$
Maltodextrina	$14 \pm 0,25$

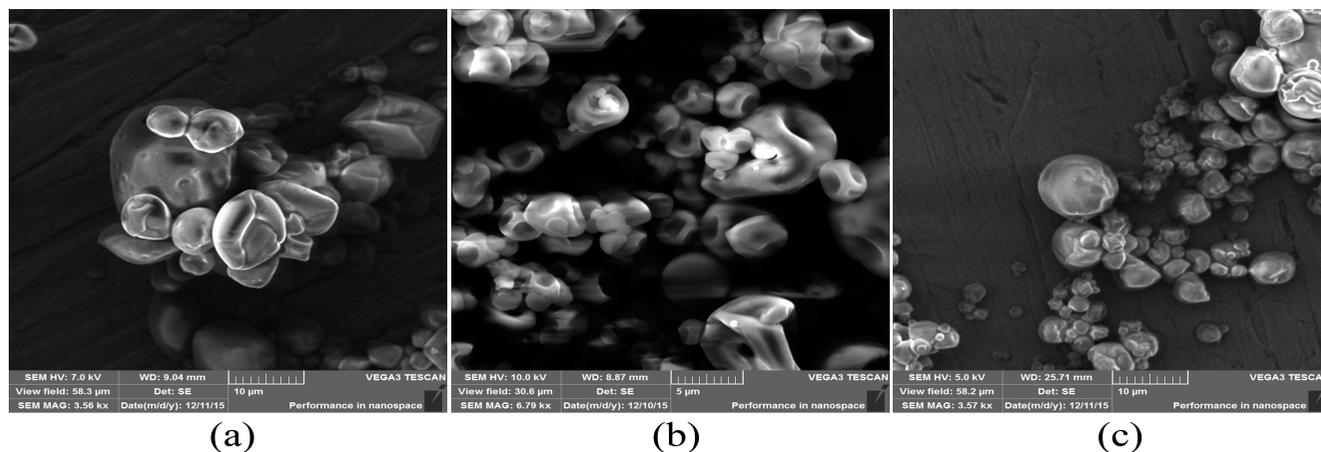


Figura 4. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) para los encapsulantes evaluados: (a) masterdry, (b) goma arábiga, (c) maltodextrina

En cuanto a la morfología, se observa que las microcápsulas producidas con masterdry (Figura 4 (a)) presentan una forma esférica, sin porosidades y con pared continua. Sin embargo, se presentan abolladuras superficiales, producto de la contracción de las microcápsulas que ocurre por la elevada velocidad de evaporación, causada a su vez por la diferencia entre la temperatura de entrada y salida del spray durante el proceso de secado por atomización (32, 33). Los almidones modificados son susceptibles a la contracción durante el secado (34). Resultados similares obtuvo Lokuwan (34) con β -caroteno microencapsulado a través de secado por aspersión con almidones de tapioca.

Por otro lado, en las micrografías obtenidas para goma arábiga (Figura 4 (b)), se observan superficies externas redondeadas, arrugadas y cóncavas, sin fisuras evidentes y con pared continua. Esto se debe a la propiedad viscoelástica y de formación de la pared propia de la goma arábiga, lo que genera menor permeabilidad a los gases y es importante para la protección del aceite encapsulado (9, 25); la ausencia de poros indica una cobertura completa de la goma sobre el aceite (12). Morfología similar fue observada por Bertolini *et al.* (35) y Trinidad y Grosso (36), quienes microencapsularon con goma arábiga monoterpenos y ácido ascórbico, respectivamente. Finalmente en las microcápsulas obtenidas con maltodextrina (Figura 4 (c)) se observa una estructura esférica y redondeada, con una superficie lisa en su mayoría pero también algunas con pequeñas abolladuras. Esto concuerda con los resultados observados por Caparino *et al.* (37) y Ersus y Yurdagel (38) en sus estudios de microencapsulación por secado por atomización, empleando maltodextrina como encapsulante en extractos de mango y pigmentos de zanahoria negra (*Daucus carota* L) respectivamente. Así mismo, Olaya *et al.* (15) reportaron partículas que exhibían superficie lisa en la microencapsulación con maltodextrina de antocianinas de mora de castilla (*Rubus glaucus*) y lulo (*Solanum betaceum*).

Conclusiones

Con este estudio, se demuestra la posibilidad de obtener microcápsulas de aceite de mora utilizando como materiales encapsulantes masterdry, goma arábiga y maltodextrina mediante la técnica de secado por aspersión.

En el proceso de microencapsulación, la temperatura de entrada del aire fue la única variable estadísticamente significativa que afectó de manera positiva el rendimiento y de forma negativa la eficiencia, cuando se usaron como encapsulantes masterdry y goma arábiga. El caudal de alimentación de emulsión fue estadísticamente significativo e influyó negativamente el rendimiento del proceso únicamente cuando se usó maltodextrina como material encapsulante. La velocidad de entrada del aire no tuvo efecto significativo sobre el rendimiento y la eficiencia del proceso.

La goma arábiga resultó ser el mejor encapsulante debido a su conformación estructural que le confiere excelentes propiedades tanto emulsificantes como formadoras de película. En cuanto al tamaño de partícula, se obtuvieron microcápsulas con tamaños de 8,2; 11,8 y 14 μm , para masterdry, goma arábiga y maltodextrina, respectivamente. Esto concuerda con lo reportado en la literatura, donde el intervalo de tamaños para microcápsulas obtenidas en equipos de secado por aspersión varía de 5 a 20 μm . Respecto a la morfología, en todos los encapsulados se observó una superficie continua en las paredes con ausencia de poros o grietas, lo que está relacionado con las altas eficiencias de microencapsulación. Finalmente, el proceso de microencapsulación con los tres encapsulantes estudiados permitió proteger el aceite de mora y conservar su perfil de ácidos grasos, en su mayoría, durante tres meses.

Referencias

- Grijalba Rativa, M.; Calderón Medellín, A.; Pérez Trujillo, M. Rendimiento y calidad de la fruta en mora de castilla (*Rubus glaucus*) con y sin espinas, cultivada en el campo abierto en Cajicá (Cundinamarca, Colombia). *Revista Facultad de Ciencias Básicas* **2010**, *6* (1), 24-41.
- Cardona, J. 2500 toneladas diarias de basura buscan acomodarse. *Rev. Amb. El Reto*. **2002**, *42*, 20-27.
- Hurtado Benavides, A.; Martín Álvarez, P. J.; Vázquez, L.; Reglero, G.; Señoráns, F. J.; Ibanez, E. Optimization of countercurrent supercritical fluid extraction of minor components from olive oil. *Curr. Anal. Chem.* **2014**, *10*, 78-85. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1573411011410010007>.

4. Martins, M.; Barreiro, M. F.; Coelho, M.; Rodrigues, A. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chem. Eng. J.* **2014**, *245*, 191–200. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.02.024>.
5. Dziezak JD. Microencapsulation and encapsulation ingredients. *J. Food Technol.* **1998**, *42*, 136-151.
6. López, O. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia* **2010**, *33* (3), 381-389.
7. Favaro, C.; Santana, A.; Monterrey, E.; Trinidad, M.; Netto, F. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids* **2010**, *24* (4), 336-340. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.012>.
8. Krishnan, S.; Kshirsagar, A. C.; Singhal, R. S. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydr Polym.* **2005**, *62*, 309–315. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.03.020>.
9. Jimenez, M.; García, H. S.; Beristain, C. I. Spray-drying microencapsulation and oxidative stability of conjugated linoleic acid. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219*, 588–592. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-004-0992-4>.
10. Rendón Galindo, G. M.; Báez González, J. G.; Alanís Guzmán, M. G.; Regalado Méndez, A.; Vernon Carter, E. J. Estabilidad oxidativa de aceite de linaza microencapsulado con multicapas de biopolímeros. *AMIDIQ.* **2010**, 2207-2212.
11. Partanen, R.; Raula, J.; Seppänen, J.; Buchert, J.; Kauppinen, E.; Forsell, P. Effect of relative humidity on oxidation of flaxseed oil in spray dried whey protein emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (14), 5717–5722. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf8005849>.
12. Frascareli, E. C.; Silvae, V. M.; Tonon, R. V.; Hubinger, M. D. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food Bioprod. Process.* **2012**, *90*, 413–424. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.002>.
13. Bae, E. K.; Lee, S. J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *J. Microencapsul.* **2008**, *25* (8), 549–560. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/02652040802075682>.
14. Villacrez, J. L.; Carriazo, J. G.; Osorio, C. Microencapsulation of Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth.) aqueous extract by spray drying. *Food Bioprocess Technol.* **2014**, *7* (5), 1445-1456. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-013-1172-y>.
15. Olaya, C.; Castaño, M.; Garzón, G. Efecto de la temperatura, almacenamiento y la actividad de agua sobre la estabilidad de antocianinas de *Rubus glaucus* y *Solanum betaceum Cav. dark-red strain*. *Acta biol. Colomb.* **2009**, *14* (3), 141-156.
16. Kha, T. C.; Nguyen, M. H.; Roach, P. D.; Stathopoulos, C. E. Microencapsulation of Gac oil: Optimisation of spray drying conditions using response surface methodology. *Powder Technol.* **2014**, *264*, 298–309. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2014.05.053>.
17. Tonon, R. V.; Brabet, C.; Hubinger, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *J. Food Eng.* **2008**, *88*, 411–418. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.029>.
18. Tee, L. H.; Chuah, L. A.; Pin, K. Y.; Rashid, A. A.; Yusof, Y. A. A. Optimization of spray drying process parameters of *Piper betle* L. (sirih) leaves extract coated with maltodextrin. *J. Chem. Pharm. Res.* **2012**, *4* (3), 1833-1841.
19. AOAC. Official Method 922.06. Fat in Flour Acid Hydrolysis Method: Association of Official Analytical Chemists; 2005.
20. Hurtado-Benavides, A.; Dorado, D. A.; Sánchez-Camargo, A. P. Study of the fatty acid profile and the aroma composition of oil obtained from roasted Colombian coffee beans by supercritical fluid extraction. *J. Supercrit. Fluids* **2016**, *113*, 44–52. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.03.008>.
21. Cai, Y. Z.; Corke, H. Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *J. Food Sci.* **2000**, *65* (16), 1248-1252. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x>.
22. Arrazola, G.; Herazo, I.; Alvis, A. Microencapsulación de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante Secado por Aspersión y Evaluación de la Estabilidad de su Color y Capacidad Antioxidante. *Inf. Tecnol.* **2014**, *25* (3), 31-42. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642014000300006>.
23. Toneli, J.; Park, K. J.; Murr, F.; Negreiros, A. Spray drying optimization to obtain inulin powder. Proceedings of the 15th International Drying Symposium. 2006.
24. Bringas-Lantigua, M.; Expósito-Molina, I.; Reineccius, G. A.; López-Hernández, O.; Pino, J. A. Influence of spray-dryer air temperatures on encapsulated mandarin oil. *Drying Technol.* **2011**, *29*, 1511-1517. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/07373937.2010.513780>.
25. Gharsallaoui, A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 1107–1121. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.
26. Gómez-Cruz, N. I.; Jiménez-Munguía, M. T. Métodos de secado de emulsiones alimentarias. *TSIA.* **2014**, *8* (2), 23-33.
27. Kenyon, M. Modified starch, maltodextrin, and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation. ACS symposium series. *ACS Symp. Ser.* **1995**, *590*, 42–50. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/bk-1995-0590.ch004>.
28. Czerniak, A.; Kubiak, P.; Białas, W.; Jankowski, T. Improvement of oxidative stability of menhaden fish oil by microencapsulation within biocapsules formed of yeast cells. *J. Food Eng.* **2015**, *167*, 2–11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.002>.
29. Calvo, P.; Hernández, T.; Lozano, M.; González-Gómez, D. Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2010**, *112*, 852–858. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201000059>.
30. López, O.; Márquez, T.; Mayo, O.; Toledo, C.; Pérez, E. Características del aceite de semillas de *Cucurbita pepo* L. microencapsulado mediante secado por aspersión con maltodextrina y goma arábiga. *Lat. Am. Journal of Pharmacy.* **2009**, *28* (4), 628-632.
31. Calvo, P.; Castaño, Á.; Lozano, M.; González-Gómez, D. Influence of the microencapsulation on the quality parameters and shelf-life of extra-virgin olive oil encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall components. *Food Res. Int.* **2012**, *45*, 256–261. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.036>.
32. Rosenberg, M.; Kopelman, I. J.; Talmon, Y. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *J. Food Sci.* **1985**, *50*, 139–144. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13295.x>.

33. Rosenberg, M.; Kopelman, I. J.; Talmon, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *J. Agric. and Food Chem.* **1990**, *50*, 139–144. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf00095a030>.
34. Lokuwan, J. Characteristics of microencapsulated b-carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids* **2007**, *21*, 928–935. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.10.011>.
35. Bertolini, A. C.; Siani, A. C.; Grosso, C. R. Stability of monoterpenes encapsulated in gum arabic by spray-drying. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 780–785. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf000436y>.
36. Trindade, M. A.; Grosso, C. R. The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum Arabic. *J. Microencapsul.* **2000**, *17*, 169–176. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/026520400288409>.
37. Caparino, O.; Tang, J.; Nindo, C.; Sablani, S. Powers, J.; Fellman, J. Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine ‘Carabao’ var.) powder. *J. Food Eng.* **2012**, *111*, 135–148. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.010>.
38. Ersus, S.; Yurdagel, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of blackcarrot (*Daucuscarota* L.) by spray dryer. *J. Food Eng.* **2007**, *80* (3), 805–812. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.07.009>.

Article citation:

Figuerola, P. M.; Ceballos, M. A.; Hurtado, A. M. Microencapsulación mediante secado por aspersión de aceite de mora (*Rubus glaucus*) extraído con CO₂ supercrítico. *Rev. Colomb. Quim.* **2016**, *45* (2), 39-47. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.57481>.



Jazmín Osorio Monsalve¹; Carlos López¹; Julián Zapata^{1,*}

¹Laboratorio de Análisis de Residuos, Instituto de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquia, Calle 67 N° 53-108, Medellín, Colombia.

*Autor para correspondencia: julian.zapatao@udea.edu.co

Recibido: 24 de Mayo de 2016. Aceptado: 16 de Julio de 2016.

Caracterización de los compuestos del aroma en rones colombianos por HS-SPME-GC-MS-O

Resumen

Se identificaron por primera vez 46 compuestos volátiles olfativamente activos con actividad aromática significativa presentes en rones comerciales de Colombia. Lo anterior, mediante microextracción en fase sólida en modo espacio de cabeza (HS-SPME), acoplada a cromatografía de gases con detectores de espectrometría de masas y olfatometría (GC-MS-O). Dentro de los compuestos identificados se encuentran ésteres, compuestos aromáticos, alcoholes, acetales, lactonas y furfural. De esos 46 compuestos, nueve están presentes en todos los rones estudiados y algunos otros son característicos solo de la marca.

Palabras clave: ron, compuestos volátiles, identificación, aroma, HS-SPME, GC-MS-O.

Characterization of aroma compounds in Colombian rums by HS-SPME-GC-MS-O

Abstract

For the first time, 46 odor-active volatile compounds present in commercial rums from Colombia were identified. This was performed through a head space-solid phase microextraction (HS-SPME) methodology, coupled to gas chromatography and mass spectrometry and olfactometry detection (GC-MS-O). Compounds included esters, aromatic compounds, alcohols, acetals, lactones and furfural. Of these 46 compounds, nine are present in all rums studied and others are brand characteristic.

Keywords: rum, volatile compounds, identification, aroma, HS-SPME, GC-MS-O.

Caracterização de compostos de aroma em rum colombiano por HS-SPME-GC-MS-O

Resumo

Foram identificados por primeira vez 46 compostos voláteis olfativamente ativos com atividade aromática significativa presentes nos rums comerciais da Colômbia. O anterior, mediante o desenvolvimento duma metodologia Head Space – Solid Phase Microextraction (HS-SPME) acoplada à cromatografia gasosa com detectores de espectrometria de massa e olfatometria (GC-MS-O). Entre os compostos identificados estão ésteres, compostos aromáticos, alcoóis, acetais, lactonas e furfural. Destes 46 compostos, nove estão presentes em todos os rums estudados e alguns outros são característicos das marcas.

Palavras-Chave: rum, compostos voláteis, identificação, aroma, HS-SPME, GC-MS-O.

Introducción

El ron es una bebida alcohólica procedente del jugo de la caña o de la melaza. Esta bebida pasa por un proceso de fermentación corta (entre 12 horas y 12 días), seguido de una destilación, ya sea en columnas fraccionadas o en alambiques de cobre y, finalmente, es envejecido en barricas de roble o tanques de acero. Sin embargo, el proceso de fabricación del ron puede cambiar de acuerdo a su lugar de origen, debido a la variación de las materias primas y a las diferencias culturales, por tanto, cada ron puede tener características únicas frente a los demás. Estas diferencias pueden estar dadas por: la variedad de la caña, la materia prima utilizada (melaza o jugo de caña), fermentación corta o larga, destilación en columna o en alambique, envejecimiento en barricas o en tanques de acero y el tiempo de envejecimiento.

Ahora bien, una de las propiedades más importantes para definir la calidad de un ron es su aroma, resultado de su composición volátil. Se han presentado varios trabajos que han estudiado la composición volátil de los rones procedentes de Jamaica (1), Puerto Rico (2) y Cuba (3, 4). Recientemente, se presentó la caracterización de los compuestos responsables del aroma de rones fabricados bajo el sistema de solera, sin indicar la procedencia de los rones estudiados (5). A la fecha no se ha reportado ningún estudio sobre los rones colombianos comerciales y, por tanto, no se tiene información sobre la composición volátil que los caracteriza.

Los métodos empleados para el análisis de compuestos volátiles en bebidas alcohólicas como el ron incluyen el fraccionamiento en columnas empacadas (6), la extracción líquido-líquido (2), evaporación del aroma asistida con disolvente (SAFE) (5) y la microextracción en fase sólida (SPME) (3); todos ellos seguidos de análisis por cromatografía de gases con detectores de masas y olfatométrico. La SPME presenta ciertas ventajas para análisis de compuestos volátiles en bebidas alcohólicas debido a su fácil implementación, además de que no requiere el uso de solventes orgánicos, evitando la interferencia de los mismos (7, 8).

El objetivo de este estudio fue elaborar un perfil de moléculas volátiles (odorantes) de los principales rones comerciales colombianos de diferentes calidades, mediante la optimización de un método de SPME en modo de espacio de cabeza (HS-SPME), seguido de análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y detector olfatométrico (GC-MS-O).

Materiales y métodos

Reactivos

La mezcla de alcanos (desde C₆ hasta C₂₅) fue suministrada por Supelco (Bellefonte, PA, USA). El agua de calidad analítica se obtuvo de un sistema de purificación Milli-Q[®] de Millipore (Bedford, USA).

Muestras

Los rones empleados en el estudio se compraron en una tienda especializada de la zona. En total fueron nueve rones colombianos de tres marcas diferentes y con envejecimiento entre tres y 12 años, con porcentaje alcohólico de 35% (v/v) (referencia comercial). Dichos rones son: Ron Medellín Añejo 3 años, 8 años y 12 años; Ron Santa Fe 4 años, 8 años y 12 años; y Ron Viejo de Caldas 3 años, 5 años y 8 años.

Entrenamiento del panel sensorial

Para la obtención del perfil aromático de las diferentes muestras se entrenó un panel sensorial olfativo conformado por diez personas (cinco hombres y cinco mujeres), con edades entre los 18 y 35 años. El entrenamiento se llevó a cabo durante seis meses en sesiones de 2 h a la semana. La metodología utilizada fue la propuesta por Steinhaus y Schieberle (1). Los catadores se entrenaron con muestras de productos con diferentes descriptores sensoriales olfativos: frutales, maderas, tostados, dulces, nueces, cítricos, florales y lácteos. Las muestras fueron puestas en recipientes oscuros marcados con un código de tres dígitos para evitar el sesgo (9).

Al finalizar el periodo de entrenamiento, los panelistas fueron sometidos a una evaluación de clasificación, que consistió en reconocer y clasificar según el olor las diferentes muestras. De esta prueba se seleccionaron seis panelistas que recibieron entrenamiento en olfatometría con una disolución de prueba preparada en el laboratorio y que, posteriormente, realizaron los análisis.

Optimización de la HS-SPME

Para asegurar la eficiencia en el proceso de extracción, la evaluación de los parámetros de extracción incluyó el estudio de cinco parámetros que afectan el proceso de HS-SPME: la naturaleza química del recubrimiento de la fibra, tiempo de extracción, volumen de muestra a extraer, dilución de la muestra y efecto salino.

En el proceso de extracción se evaluaron tres fibras con diferentes polaridades: PDMS (100 μ m), PDMS/DVB (65 μ m) y DVB/PDMS/CAR (50/30 μ m) que fueron suministradas por Supelco (Bellefonte, PA, USA). La inyección se realizó en modo manual empleando un holder de SPME de Supelco (Bellefonte, PA, USA). Se utilizaron las siguientes condiciones de partida: 5 mL de una muestra de Ron Medellín Añejo 3 Años, diluida al 50% (v/v) con una solución 6 M de NaCl, en un vial de 20 mL para HS-SPME con agitación magnética de 1000 rpm y un tiempo de exposición de 60 min a 25 °C. Una vez realizada la extracción, la fibra fue llevada al puerto de inyección del GC-MS a 250 °C durante 3 min para la desorción térmica de los analitos extraídos. En este estudio se evaluó la eficiencia de la extracción en función de la cantidad e intensidad de analitos volátiles extraídos. Todas las fibras fueron acondicionadas según la recomendación del fabricante.

Posteriormente, para optimizar el tiempo de extracción de los analitos se estudiaron tiempos de extracción de 5, 15, 30 y 60 min y volúmenes de muestra de 5, 2,5 y 1,3 mL. Dado que el proceso de extracción también es sensible a factores que modifiquen la matriz (10), se optimizó la dilución de la muestra (sin diluir, al 50%, 25% y al 12,5% v/v) y, adicionalmente, el efecto salino a concentraciones de NaCl de 1, 3 y 6 M. En todos los casos, solo se modificó el parámetro en estudio, manteniendo las demás condiciones constantes. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, fijando la temperatura a 25 °C en un baño termostático.

La temperatura es un factor crítico en el análisis por HS-SPME, puesto que favorece la transferencia de compuestos al espacio de cabeza (11, 12). Sin embargo, en este estudio se optó por fijar la extracción a 25 °C, simulando las condiciones de cata de un ron y evitando que la composición del aroma se viera afectada por el incremento de la temperatura.

Todos los análisis se realizaron en un Saturn® 2000 GC/MS Varian (Walnut Creek, CA, USA), detección de espectrometría de masas con analizador de trampa de iones con un inyector un split/splittless estándar y un liner para SPME de 0,75 mm de diámetro interno. El modo de inyección usado fue splittless a una temperatura de 250 °C, con un pulso de presión de 131 kPa durante 2,9 min. Durante el análisis, se utilizó helio como gas transportador a un flujo constante de 1 mL/min. La columna cromatográfica utilizada fue una Agilent J&W DB-WAX, de 30 m, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de película.

El horno cromatográfico inicialmente fue puesto a 40 °C durante 5 min, se incrementó a una razón de 4 °C/min hasta 100 °C, luego a una velocidad de 6 °C/min hasta 220 °C y se mantuvo durante 20 min. La temperatura de la trampa de iones se mantuvo a 200 °C y la línea de transferencia a 270 °C. El rango de masas seleccionado, como relación masa/carga, fue de 40 a 350.

Análisis de las muestras por GC-MS-O

Las muestras de ron se diluyeron al 50% con una solución 6 M de NaCl; de esta solución se tomaron 5 mL y se llevaron a un vial estándar de 20 mL para HS-SPME. Posteriormente, la fibra de PDMS/DVB fue puesta en el espacio de cabeza de la muestra por 60 min a 25 °C con agitación constante (1000 rpm). Al terminar el proceso de extracción, se retiró la fibra del vial y fue llevada al puerto de inyección del GC-MS-O para la desorción térmica de los analitos a una temperatura de 250 °C durante 3 min.

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent 7890 (Santa Clara, CA, USA), acoplado simultáneamente a un puerto de olfacción de temperatura programable Gerstel ODP (Mülheim an der Ruhr, Alemania), con sistema de detección olfatométrico y un detector de espectrometría de masas 5973 Network con analizador tipo cuádruplo. El cromatógrafo contó con un inyector de tipo split/splittless estándar y se utilizó un liner para SPME de 0,75 mm de diámetro interno. El modo de inyección usado fue splittless a una temperatura de 250 °C, con un pulso de presión de 62 kPa durante 1 min. Se usó helio (grado 5,0 analítico) como gas portador, a flujo constante de 1 mL/min durante todo el análisis.

La columna cromatográfica utilizada fue una DB-WAX de 60 m; 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de película (Agilent J&W Scientific). La temperatura inicial del horno cromatográfico fue de 50 °C durante 3 min, luego se incrementó a una velocidad de 3 °C/min hasta 160 °C, finalmente se llevó a 250 °C a una velocidad de 25 °C/min y se mantuvo durante 22 min (tiempo final de análisis 60 min).

La temperatura del detector se mantuvo a 250 °C y la línea de transferencia a 250 °C. El rango de masas seleccionado, como relación masa/carga, fue de 40 a 400. La temperatura del puerto de olfacción fue programada a través de una rampa lineal de calentamiento que inició en 80 °C y subió hasta 250 °C a una velocidad de 4 °C/min.

Durante cada análisis, los jueces evaluaron los olores efluentes. Cada vez que se reconocía un olor, se registraba el tiempo de retención y la descripción del olor. Cada inyección fue realizada por dos jueces entrenados, cada uno durante un tiempo de 30 min. Las muestras de ron fueron evaluadas por seis jueces y cada uno realizó el análisis completo de cada muestra en dos sesiones diferentes.

Cálculo de los Índices de Retención (LRI)

Para realizar el cálculo de los índices de retención experimentales, se analizó un estándar que contenía una serie de alcanos lineales desde C6 hasta C25 bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras analizadas. Se calculó el LRI a cada compuesto que presentó una respuesta sensorial (13).

Identificación de los compuestos

La identificación de los compuestos sensorialmente activos se realizó con tres criterios: comparación con un espectro de masas de referencia de la base de datos NIST Mass Spectral Library 2014; comparación con los índices de retención lineales reportados en la literatura (2-6) en una fase polar y por olfatometría, comparando la descripción de la percepción olfativa realizada por los jueces respecto a la descripción olfativa de referencia de cada compuesto.

El criterio para aceptar la identificación de un compuesto fue la correcta correspondencia del espectro de masas, el índice de retención y la descripción olfativa con los datos de referencia reportados para cada compuesto.

Resultados y discusión

Parámetros de optimización de la HS-SPME

Para seleccionar la fase extractora del proceso HS-SPME se evaluó la cantidad de compuestos volátiles extraídos y la señal cromatográfica de estos con tres fibras de polaridades diferentes como se muestra en la Figura 1. La Fibra de PDMS tuvo el más bajo rendimiento en la extracción, debido a que la extracción de compuestos polares volátiles presentes en el ron se ve afectada por la naturaleza apolar de la fase. El rendimiento de las fibras de PDMS/DVB y CAR/DVB/PDMS fue similar en cuanto al número de compuestos extraídos. Sin embargo, con la fibra de PDMS/DVB se obtuvo una mayor eficiencia en la extracción de los compuestos volátiles odorantes y, por tanto, fue la fase seleccionada para el análisis. Estos resultados difieren de la fase seleccionada (PDMS) por Pino (3, 4, 14) para el estudio de compuestos volátiles en rones cubanos, sin embargo, el autor no presenta resultados que justifiquen la selección de esa fase extractora.

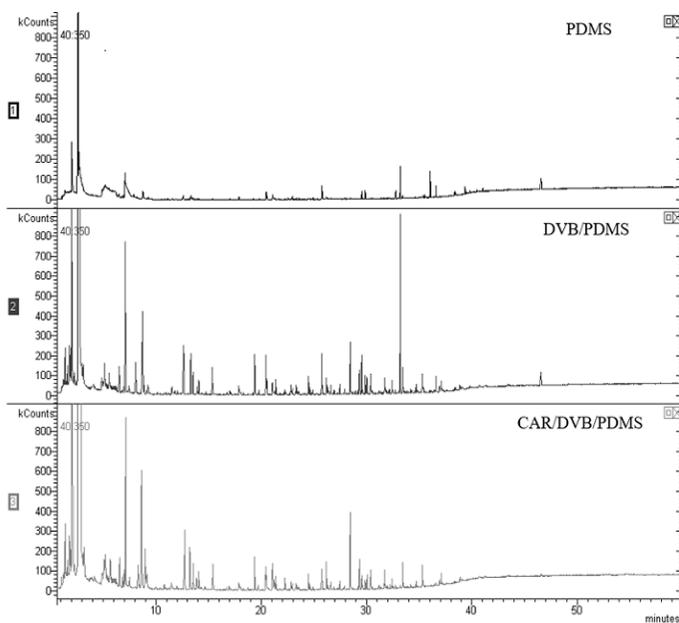


Figura 1. Cromatogramas de la extracción de compuestos volátiles en rones colombianos con diferentes fibras de SPME

Después de elegir el tipo de fibra, se evaluó el efecto del tiempo de exposición de la fibra de SPME al espacio de cabeza de las muestras (5, 15, 30 y 60 min) (Figura 2). Se encontró que, al aumentar el tiempo de extracción, se aumenta también la cantidad de compuestos volátiles extraídos (representado por la suma total de las áreas de todos los picos en el cromatograma). Se evidenció que, a 60 min, el sistema llegó prácticamente al equilibrio de los analitos en los procesos de partición líquido-HS y HS-fibra, por tanto, se eligió continuar el estudio con un tiempo de extracción de 60 min, que coincide con el tiempo del análisis cromatográfico.

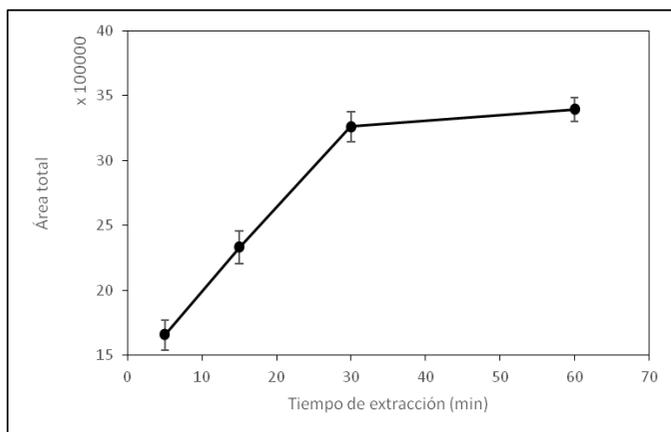


Figura 2. Efecto del tiempo de extracción de la fibra en el proceso HS-SPME de compuestos volátiles presentes en rones colombianos

Se evaluó también el efecto de la dilución de la muestra: en la mayoría de los licores se presentan problemas para la extracción de los analitos volátiles, debido al alto contenido de etanol. Este produce la saturación del espacio de cabeza y de los sitios activos de la fibra de SPME por la elevada presión de vapor a temperatura ambiente.

En todos los rones estudiados el contenido de etanol fue de 35% (v/v). A esta concentración, el alcohol compite con los demás analitos por el espacio de cabeza y por los sitios activos de la fibra, disminuyendo la eficiencia del proceso de extracción (3, 10). Así, cuando se diluyó la muestra y el contenido de etanol era del 17,5%, la extracción de los demás analitos volátiles fue favorable, porque el etanol se encontraba en menor proporción en el espacio de cabeza. Sin embargo, cuando el contenido de etanol era del 12% y 7,5%, los analitos también se diluyeron en una proporción considerable, disminuyendo su concentración en el espacio de cabeza y, consecuentemente, la extracción de estos se vio afectada (Figura 3). Estos resultados coinciden con los previamente reportados (3, 15). Por lo anterior, se eligió una dilución de la muestra con contenido de etanol del 17,5% como parámetro óptimo para los análisis.

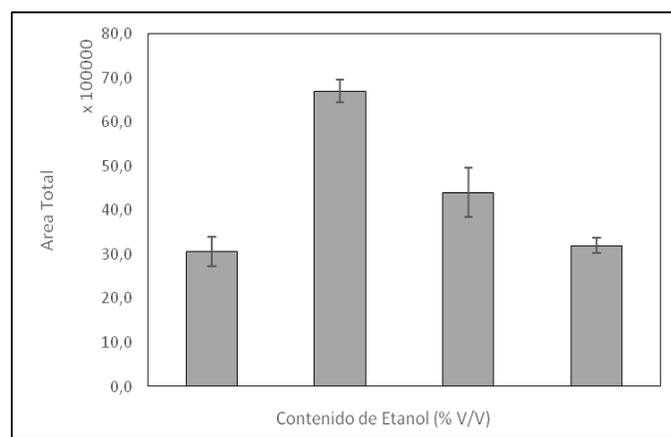


Figura 3. Efecto de la dilución de la muestra sobre los compuestos volátiles

Del mismo modo, se evaluó el efecto del volumen de la muestra en el proceso de extracción. Para ilustrar la evaluación de este parámetro se realizó el seguimiento de tres compuestos presentes en las muestras de ron: acetato de etilo, 2-feniletanol y lactona de roble, que eluyen al inicio y al final del análisis cromatográfico (Figura 4). Al aumentar el volumen de la muestra (disminución del volumen del espacio de cabeza), aumentaron las áreas de los compuestos volátiles extraídos. Los compuestos más volátiles, como es el caso del acetato de etilo, tuvieron un mayor aumento, razón por la cual se decidió seguir el estudio con 5 mL de muestra.

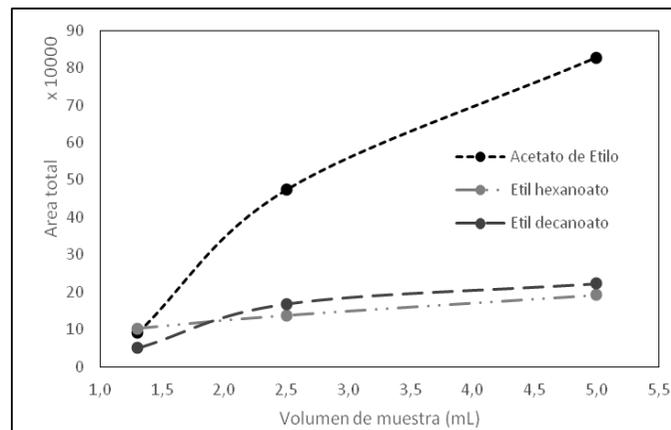


Figura 4. Efecto del volumen del espacio de cabeza en tres analitos: acetato de etilo, etil hexanoato y etil docanoato

Tabla 1. Compuestos odorantes identificados en los rones colombianos estudiados por HS-SPME-GC-MS-O

LRI	Compuesto	Olor	RM3	RM8	RM12	RS4	RS8	RS12	RV3	RV5	RV8
900	Acetato de etilo	Dulce, frutal, alcohol	x	x	x	x	x	x	x	x	x
941	Etanol	Dulce, alcohol	x	x	x	x	x	x	x	x	x
955	Metil ciclohexanol	Fruta Madura	x								
967	Propanoato de etilo	Frutal, fresco, fresa	x						x		
971	Propionato de etilo	Dulce, Galleta	x								
976	Isobutanoato de etilo	Frutal, fresa								x	
981	1,1-Dietoxi-2-metilpropano	Dulce, frutal	x								
1022	Isobutanoato de etilo	Tabaco							x	x	
1045	Butanoato de etilo	Dulce, frutal		x	x				x	x	x
1061	2-metilbutanoato de etilo	Frutal, dulce, uvas pasas	x	x			x				
1072	Isovalerato de etilo	Dulce, floral		x			x	x			
1079	1,1-Dietoxi-3-metilbutano	Dulce, frutal	x	x	x						
1080	2-Metil-3-butan-2-ol	Dulce, frutal	x								
1082	Acetato de butilo	Frutal, desagradable						x			
1098	Isobutanol	Reactivo							x		
1126	Isoamil acetato	Banano, dulce	x	x	x		x	x	x	x	x
1146	Valerato de etilo	Dulce, frutal	x	x	x		x	x	x	x	
1155	<i>p</i> -Xileno	No reconoce						x			x
1198	Propanoato de 3-metilbutilo	Dulce, fresa								x	x
1212	3-metil-1-butanol	Vinagre, ácido, queso		x	x	x	x	x	x	x	x
1241	Hexanoato de etilo	Frutal, Dulce	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1337	Heptanoato de etilo	Dulce, floral	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1446	Octanoato de etilo	Dulce, láctico	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1491	Furfural	Galletas, frutal, herbal	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1526	Nonanoato de etilo	Láctico, harina				x	x	x			
1596	Malonato de dietilo	Frutal					x	x			
1660	Caproato de etilo	Suave, tierra								x	
1679	(4E)-4-decenoato de etilo	Seco, verde									x
1696	Succinato de dietilo	No reconoce				x	x	x			x
1703	Dec-9-enoato de etilo	Tierra, tostado								x	
1775	1,1,6-Trimetil-1,2-dihidronaftaleno	Quemado, ahumado	x								x
1785	(E)-Anatole	Dulce			x		x	x			
1799	Naftaleno	Ahumado	x	x	x	x	x	x			
1801	Salicilato de metilo	Floral, fresco	x	x			x		x		
1803	2-feniletanoato de etilo	Ahumado			x						
1815	2-feniletil acetato	Malta, dulce		x	x						x
1829	Laurato de etilo	Queso, pies	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1837	2-Metilnaftaleno	Floral, químico			x	x	x	x			
1850	2-feniletanol	Dulce, floral		x	x	x	x	x			
1861	(trans)-lactona de roble	Madera, tostado, fenol	x	x	x	x	x	x			
1870	Miristato de isopropilo	Fresco, floral									x
1874	Miristato de etilo	Ahumado		x	x	x	x				
1876	Tetradecanoato de metilo	Dulce, agrio	x								
1904	1,6,7-Trimetilnaftaleno	Vinagre, desagradable					x				
1907	2,3,6-Trimetilnaftaleno	Vinagre, maíz, grano	x								
2032	Vainillina	Dulce, floral	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Los compuestos fueron identificados por la correcta correspondencia entre los espectros de masas, LRI y olor de cada compuesto con los reportados en la literatura, excepto el succinato de dietilo para el cual no se reconoció el olor del compuesto.

RM3, RM8 y RM12 corresponden a Ron Medellín 3, 8 y 12 años respectivamente; RS4, RS8 y RS12 a Ron Santa Fe 4, 8 y 12 años respectivamente y RV3, RV5 y RV8 a Ron Viejo de Caldas 3, 5 y 8 años respectivamente.

Finalmente, se estudió el efecto salino, dado que la adición de una sal a la muestra puede afectar los coeficientes de partición de los analitos. Se observó un aumento significativo de la intensidad de los compuestos volátiles extraídos, conforme se aumentó la fuerza iónica (datos no mostrados). Por ello, la dilución de las muestras se realizó con una solución de NaCl 6 M. Al evaluar el efecto salino, mediante una prueba triangular con el panel sensorial se verificó que el perfil aromático de las muestras no cambiaría al modificar la fuerza iónica del sistema.

Compuestos aromáticos activos identificados por GC-O

En este estudio se identificaron 46 compuestos volátiles sensorialmente activos presentes en los diferentes rones estudiados. Dentro de los compuestos identificados se encuentran 26 ésteres, seis compuestos aromáticos, seis alcoholes, dos acetales, la *trans*-lactona de roble, furfural, salicilato de metilo, (*E*)-anetol, 2-metilbutanoato de etilo y vainillina (Tabla 1). Los descriptores odorantes más representativos fueron frutales, dulces, maderas, vinagres y florales.

Así, el aroma de los rones estudiados está constituido principalmente por ésteres, alcoholes e hidrocarburos aromáticos que son generados en el proceso de fermentación (16). Los ácidos también son compuestos característicos en el aroma de rones, que se generan por oxidación de lípidos saturados constituyentes de la caña, cuya producción se incrementa con el tratamiento térmico de la materia prima (2). Entre los más abundantes que se han reportado se encuentran el ácido acético, ácido hexanoico, ácido octanoico y ácido decanoico (17). Sin embargo, en las muestras de rones colombianos estudiados no se encontró ningún ácido, pero sí los ésteres derivados de los ácidos enunciados anteriormente. Se infiere que estos ácidos pueden ser esterificados probablemente por condiciones propias del proceso y del añejamiento.

Por su parte, los hidrocarburos aromáticos son compuestos que generalmente se producen en un proceso de combustión y que, a concentraciones altas, pueden llegar a tener un impacto negativo en la calidad olfativa. Es probable que estos se formen en el proceso de tostado de la barrica, y posteriormente sean transferidos al ron en el proceso de envejecimiento (18).

De los compuestos volátiles olfativos identificados, se distinguen nueve compuestos que están presentes en todos los rones estudiados: acetato de etilo, etanol, hexanoato de etilo, heptanoato de etilo, octanoato de etilo, furfural, caproato de etilo, laureato de etilo y vainillina. Estos compuestos podrían hacer parte de la base del aroma del ron, puesto que se producen en etapas básicas del proceso, por lo cual es normal que se encuentren presentes en todas las muestras. Por ejemplo, el etanol se produce en la etapa de fermentación alcohólica, los ésteres en el añejamiento y el furfural en la deshidratación del jugo de caña.

Además de lo anterior, en el Ron Santa Fe 12 años se encontró el *p*-xileno, un compuesto que no ha sido reportado en ningún tipo de ron. La presencia de este compuesto podría deberse al proceso de añejamiento, donde posiblemente se formó tras el tostado de la barrica (dependiendo del tipo de roble empleado) (19).

Se evaluó también el efecto de la dilución de la muestra: en la mayoría de los licores se presentan problemas para la extracción de los analitos volátiles, debido al alto contenido de etanol. Este produce la saturación del espacio de cabeza y de los sitios activos de la fibra de SPME por la elevada presión de vapor a temperatura ambiente.

Analizando los compuestos identificados por marca (Ron Medellín Añejo, Ron Santa Fe y Ron Viejo de Caldas), se observa que Ron Medellín Añejo presenta un compuesto característico: el 1,1-dietoxi-3-metilbutano, que tiene un descriptor aromático dulce-frutal. Este compuesto de la familia de los acetales se forma por reacción de los aldehídos con etanol (4). En Santa Fe se identificó el succinato de dietilo, con descriptor aromático vinoso-fruta, este compuesto se produce por acción de las levaduras en el proceso de fermentación (4). Por el contrario, en el caso de Ron Viejo de Caldas no se encontró ningún compuesto característico.

Conclusiones

Se establecieron las condiciones óptimas para realizar el proceso de extracción por HS-SPME de los compuestos volátiles presentes en el ron, evaluando el tipo de fibra, el tiempo de extracción, la dilución de la muestra, el volumen de la muestra y el efecto salino.

Aplicando el método desarrollado, se identificaron por primera vez 46 compuestos volátiles odorantes presentes en nueve rones colombianos comerciales, resaltando las notas odorantes a madera, dulce, floral, frutales y vinagrosas. Además, se estableció una lista de compuestos volátiles odorantes que se encuentran presentes en todos los rones estudiados. Esta lista de compuestos permitirá realizar estudios posteriores de cuantificación de los odorantes involucrados en la formación del aroma, que, acompañado de estudios de reconstitución de aromas, pueden dar lugar al desarrollo del papel de cada uno de estos compuestos en el aroma de los rones colombianos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI), Fondo de apoyo al primer proyecto (proyecto IN654CE) de la Universidad de Antioquia.

Referencias

- Steinhaus, P.; Schieberle, P. Characterization of the key aroma compounds in soy sauce using approaches of molecular sensory science. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (15), 6262-6269. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf0709092>.
- de Souza, M.; Vásquez, P.; del Mastro, N. L.; Acree, T. E.; Lavin, E. H. Characterization of Cachaça and Rum Aroma. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (2), 485-488. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf0511190>.
- Pino, J. A. Characterization of rum using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* **2007**, *104* (1), 421-428. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.031>.
- Pino, J. A.; Tolle, S.; Gök, R.; Winterhalter, P. Characterisation of odour-active compounds in aged rum. *Food Chem.* **2012**, *132* (3), 1436-1441. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.133>.

5. Franitza, L.; Granvogl, M.; Schieberle, P. Characterization of the key aroma compounds in two commercial rums by means of the sensomics approach. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (3), 637-645. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05426>.
6. Maarse, H.; de Brauw, N. M. C. The analysis of volatile components of jamaica rum. *J. Food Sci.* **1966**, *31* (6), 951-955. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1966.tb03275.x>.
7. Ferreira, V.; Herrero, P.; Zapata, J.; Escudero, A. Coping with matrix effects in headspace solid phase microextraction gas chromatography using multivariate calibration strategies. *J. Chromatogr. A.* **2015**, *1407*, 30-41. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.058>.
8. Zapata, J.; Mateo-Vivaracho, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. Comparison of extraction techniques and mass spectrometric ionization modes in the analysis of wine volatile carbonyls. *Anal. Chim. Acta.* **2010**, *660* (1-2), 197-205. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.09.041>.
9. Feng, Y.; Cai, Y.; Su, G.; Zhao, H.; Wang, C.; Zhao, M. Evaluation of aroma differences between high-salt liquid-state fermentation and low-salt solid-state fermentation soy sauces from China. *Food Chem.* **2014**, *145*, 126-134. DOI: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613010017>.
10. Mestres, M.; Sala, C.; Martí, M. P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction of sulphides and disulphides using Carboxen-polydimethylsiloxane fibers in the analysis of wine aroma. *J. Chromatogr. A.* **1999**, *835* (1-2), 137-144. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)01050-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(98)01050-4).
11. Bogusz, S.; de Marchi Tavares de Melo, A.; Zini, C. A.; Godoy, H. T. Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction. *J. Chromatogr. A.* **2011**, *1218* (21), 3345-3350. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.060>.
12. Pizarro, C.; Pérez-del-Notario, N.; González-Sáiz, J. M. Optimisation of a simple and reliable method based on headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile phenols in beer. *J. Chromatogr. A.* **2010**, *1217* (39), 6013-6021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.021>.
13. van Den Dool, H.; Kratz, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1963**, *11*, 463-471. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)80947-X.
14. Queris, O.; Pino, J.; Martí, P.; Rodríguez, I. Packed bed techniques for accelerated aging of rum. *Revista CENIC Ciencias Químicas.* **2007**, *38* (2), 319-324.
15. Pino, J.; Martí, M. P.; Mestres, M.; Pérez, J.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solidphase microextraction of higher fatty acid ethyl esters in white rum aroma. *J. Chromatogr. A.* **2002**, *954* (1-2), 51-57. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00167-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00167-X).
16. Singleton, V. L. Maturation of wines and spirits: comparisons, facts, and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46* (1), 98-115.
17. Sampaio, O. M.; Reche, R. V.; Franco, D. W. Chemical profile of rums as a function of their origin. the use of chemometric techniques for their identification. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (5), 1661-1668. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf0726841>.
18. Maza Gomez, S. Rum aroma descriptive analysis. Tesis de Maestria, Louisiana State University, 2001.
19. Regalado, E. L.; Tolle, S.; Pino, J. A.; Winterhalter, P.; Menendez, R.; Morales, A. R. *et al.* Isolation and identification of phenolic compounds from rum aged in oak barrels by high-speed countercurrent chromatography/high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry and screening for antioxidant activity. *J. Chromatogr. A.* **2011**, *1218* (41), 7358-7364. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.068>.

Article citation:

Osorio-Monsalve, J.; López, C.; Zapata, J. Caracterización de los compuestos del aroma en rones colombianos por HS-SPMEGC-MS-O. *Rev. Colomb. Quim.* **2016**, *45* (2), 48-54. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.60406>.

Descripción

La Revista Colombiana de Química (Rev. Colomb. Quim., versión online ISSN 2357-3791, versión impresa ISSN 0120-2804) es una publicación científica arbitrada, del Departamento de Química, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Desde su lanzamiento en 1971, y hasta 1980, la Revista Colombiana de Química publicó un volumen por año y su periodicidad cambió a uno o dos volúmenes por año desde 1981 hasta 2006. A partir de 2007 y hasta la fecha publica tres volúmenes por año. Todos sus volúmenes se encuentran disponibles online en el sitio web <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/index>.

La Revista Colombiana de Química se encuentra indexada en las bases de datos SCOPUS, PUBLINDEX, DOAJ, SCIELO, LATINDEX Y REDALYC. Esta publicación cuenta con un Comité Científico y Editorial compuesto por investigadores de reconocida trayectoria en sus áreas de especialidad y acepta contribuciones relevantes en las diversas áreas de la química tales como química analítica, bioquímica, orgánica, fisicoquímica, alimentos, inorgánica, ciencias de materiales, organometálica, enseñanza de la química, entre otras. El público objetivo son profesionales relacionados con cualquier área de la química.

Tipos de artículos

Artículos de investigación

Son artículos que presentan resultados de investigación que no han sido publicados previamente. Los autores deben resaltar la contribución de su trabajo al conocimiento. Se sugiere un máximo de 40 referencias.

Artículos de revisión

Serán solicitados por invitación del Comité Editorial, teniendo en cuenta la experiencia de los autores en un determinado tema. Son artículos que presentan el estado actual del conocimiento sobre un tema. En este tipo de artículos, el autor además de efectuar la revisión, debe establecer su aporte y criterio propios. Debe presentar más de 50 referencias, preferiblemente de los últimos 5 años.

Ética

En la Revista Colombiana de Química se toma como código de conducta ética el propuesto por el Comité de Ética de Publicaciones (COPE): <http://publicationethics.org/> para editores de revistas científicas. En este se sancionan el plagio y la autoría fantasma, la duplicación de resultados o cualquier otro tipo de modificación fraudulenta. De igual modo se promueve y aplica un sistema de evaluación por pares donde se garantiza el anonimato de autores y evaluadores.

Conflicto de intereses

La revista define un conflicto de interés como cualquier asunto que interfiera en: la presentación completa y objetiva, la revisión por pares, la toma de decisiones editoriales, o la publicación de artículos de investigación presentados a la revista. El conflicto de intereses puede ser de naturaleza financiera y no financiera, profesional o personal, y puede surgir en relación a una organización u otra persona.

Envío y esquema de revisión general

Los manuscritos enviados a la Revista Colombiana de Química para su posible publicación deben ser inéditos (**no sometidos al mismo tiempo a ninguna otra revista impresa o digital**). Los autores son responsables por las opiniones e ideas declaradas en el manuscrito. La precisión de la información en los manuscritos, incluyendo figuras y tablas, es responsabilidad completa del autor o de los autores.

Los manuscritos serán recibidos para su evaluación vía correo electrónico (rcolquim_fcbog@unal.edu.co) o a través de la plataforma en línea de la Revista (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim>).

Requisitos generales de envío

1. Para los envíos a través del portal en línea, el autor debe estar registrado en el portal, de no ser el caso debe registrarse siguiendo los pasos necesarios. Antes de comenzar, es importante que compruebe que su envío cumple escrupulosamente todos los requisitos solicitados por la revista (Ver sección Preparación para el envío online).
2. La versión del documento en línea no debe incluir resumen ni datos de autores, estos se incluyen en los metadatos, es decir, en el formulario de envío. Por el contrario, si el artículo es enviado por correo electrónico debe contener todos los datos que se especifican en la sección Formato.

Para las dos formas de envío deben adjuntarse una carta de presentación del artículo, donde se incluyan los aspectos más relevantes del artículo, una lista de tres posibles evaluadores con sus respectivos datos de contacto y firma de todos los autores.
4. Las fotos, diagramas, mapas y gráficas se enumeran como figuras. Las fotos y mapas deben adjuntarse en un archivo aparte, en formato TIFF o JPEG 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 tengan 4 o más ítems, se debe cambiar la escala de grises por diferentes tramas. No se deben insertar en Word ya que pierden la resolución, y en el programa de diseño van a salir pixeladas. Si las gráficas corresponden a archivos trabajados en Excel o Word se deben enviar en dichos programas, pero abiertas, no como imagen para que se puedan editar.

Esquema de revisión

- Después de recibir el artículo y verificar que cumpla con el formato establecido en esta guía, se envía a revisión por pares según el tema tratado.
- Después de recibir las evaluaciones, se envía la decisión del Comité Editorial al autor de correspondencia:
 - o **Aceptado con cambios mínimos:** Los autores deben enviar una nueva versión a la revista. Una vez el editor verifica que los cambios fueron realizados (los autores deben enviar una lista detallada con los cambios realizados o el porqué de los cambios no realizados), el artículo es aceptado.
 - o **Cambios mayores:** Los autores deben enviar una nueva versión a la revista, la cual será sometida a evaluación corta (los autores deben enviar una lista detallada con los cambios realizados o el porqué de los cambios no realizados).
 - o **Rechazado:** Los autores deciden si someten una nueva versión a la revista, la cual será tratada como un artículo nuevo.
- Si el artículo es aceptado aparecerá inicialmente en formato pre-impresión en la página Web de la revista (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/index>). Posteriormente se reemplazará por la versión diagramada.

Formato

El documento se debe presentar en archivo Word .doc o .docx, tamaño carta, interlineado 2,0, con márgenes superior e inferior de 2,5 cm y 3,0 cm en los lados, con letra Times New Roman 12, páginas numeradas de inicio a fin. Se deben usar los títulos: **RESUMEN, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUCCIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN, CONCLUSIONES, AGRADECIMIENTOS y REFERENCIAS.**

Idioma

Los manuscritos se aceptan en español, inglés o portugués, sin embargo, siempre **el título, resumen y palabras claves deben presentarse en los tres idiomas.** Como estrategia para aumentar la difusión y visibilidad de los resultados se sugiere presentar los manuscritos en inglés.

Página inicial

Título

El título debe ir en minúscula, a menos que la mayúscula sea mandatoria. Debe ser conciso pero informativo y no debe exceder 120 caracteres incluyendo los espacios. Debe aparecer siempre en español, inglés y portugués. Por ejemplo:

- Oxidación catalítica de tolueno y 2-propanol sobre óxidos mixtos de Mn y Co obtenidos por coprecipitación.
- Catalytic oxidation of toluene and 2-propanol over Mn and Co mixed oxides obtained by coprecipitation method.
- A oxidação catalítica de tolueno e 2-propanol em óxidos mistos de Mn e de Co, obtidos por coprecipitação.

Autor(es) y filiación

- Nombres y apellidos completos.
- Último título profesional.
- Institución en la cual trabaja.
- País y ciudad de residencia.
- Correo electrónico (de cada autor).

En los datos de filiación se debe conservar el orden categórico: Laboratorio, instituto, universidad, ciudad, estado, país, e-mail. Cada filiación debe ser enlistada con números en superíndice y referenciada a cada autor. El autor de correspondencia debe ir denotado con asterisco. Por ejemplo:

Mauricio Acelas¹, Elizabeth Gil², Markus Doerr³, Martha Daza³, Juan Manuel Urbina^{1*}

¹Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular - LQOBio, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Ciudad Universitaria, AA 678, Bucaramanga, Colombia.

²Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 N° 43-82, Bogotá D.C., Colombia.

³Grupo de Bioquímica Teórica - GBQT, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Ciudad Universitaria, AA 678, Bucaramanga, Colombia.

*Autor para correspondencia: jurbina@uis.edu.co

Cuerpo del artículo

Todo el texto debe venir justificado (alineado a izquierda y derecha), con las páginas y líneas numeradas continuamente. Todos los títulos y subtítulos primarios y secundarios deben ir justificados a la izquierda. Los títulos (**RESUMEN, PALABRAS CLAVE, INTRODUCCIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN, AGRADECIMIENTOS, CONCLUSIONES y REFERENCIAS**) deben ir con mayúscula sostenida y en negrilla. Los **subtítulos primarios** con minúsculas sostenida y en negrilla. Los *subtítulos secundarios* con minúscula sostenida y en cursiva. Siempre se deben definir los términos estadísticos, abreviaturas y los símbolos la primera vez que se usan en el artículo. Para las unidades de medida se debe usar el sistema métrico internacional.

Cuando no van seguidos de unidades, los números enteros hasta diez se escriben con la palabra (uno, dos, diez) y mayores de diez con números (11, 12, 102). Cuando se utilicen números, estos deben ir seguidos de sus unidades y se mantendrá un espacio entre uno y otro (100 m, 50 mL). Si se trata de porcentaje no deje espacio entre el número y la unidad (80%). En manuscritos escritos en español las cifras decimales irán separadas por coma (,) y en inglés por punto (.). Cite cada figura y tabla en el texto de acuerdo al orden de aparición y en el siguiente formato: Figura 1 o Figuras 1 y 2 o Figuras 1A-1F o Tabla 1.

Resumen

Resumen de máximo 200 palabras. Se sugiere poner una frase introductoria. 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. Debe evitar presentarse un resumen descriptivo (aquel donde no se presentan datos), en cambio, debe presentarse un resumen analítico (aquel en donde se presentan los datos relevantes obtenidos en la investigación). Debe aparecer siempre en español, inglés y portugués.

Palabras clave

Deben listarse de 3 a 6 palabras claves. No se deben emplear las palabras ya usadas en el título del manuscrito. Deben aparecer siempre en español, inglés y portugués.

Introducción

Deben presentarse los fundamentos lógicos para la realización del trabajo. Solo se dan las referencias estrictamente oportunas y no se deben incluir datos o conclusiones del trabajo que se está publicando. Al final de la introducción, debe presentarse el objetivo del trabajo.

Materiales y métodos

En una subsección deben listarse los reactivos utilizados, la marca y el país. Se deben usar subtítulos en los procedimientos utilizados. Los procedimientos deben tener el detalle suficiente para permitir a otros profesionales reproducir la investigación. Se deben incluir los equipos empleados, incluyendo nombre del fabricante y país, además de las referencias de la metodología y métodos estadísticos. Deben describirse los métodos nuevos o los que han sido sustancialmente modificados, sustentando las razones para utilizarlos y evaluando sus limitaciones.

Los autores que envíen artículos de revisión, deberán describir los métodos empleados para localizar, seleccionar, extraer y sintetizar la información. Siempre que se hagan pruebas estadísticas, debe usarse un subtítulo "Análisis estadístico" para su descripción.

Resultados y discusión

Los resultados deben presentarse en un orden lógico y concordante con el orden de los métodos. Se deben destacar los resultados que contribuyen a la generación de nuevo conocimiento. La información contenida en tablas no debe repetirse en figuras y viceversa.

En la discusión deben destacarse los aspectos nuevos y relevantes del estudio, y evitar repetir información ya facilitada en la sección INTRODUCCIÓN. Se recomienda evaluar posibles relaciones entre los resultados obtenidos, juzgar los resultados en relación con los obtenidos por otros autores, y proponer hipótesis que expliquen los datos obtenidos. En esta sección debe haber una extensión mínima de tres páginas a doble espacio.

Conclusiones

Debe aparecer mínimo un párrafo con las conclusiones, vinculado a los objetivos del estudio, evitando enumerarlas o presentarlas como frases sueltas. Se deben realizar afirmaciones plenamente respaldadas por los datos.

Agradecimientos

Deben mencionarse las fuentes de financiación de los proyectos de investigación y/o apoyos recibidos para la realización del estudio (becas, equipos, reactivos, entre otros). Pueden nombrarse a aquellas personas que hayan prestado su ayuda intelectual al trabajo, pero cuyas contribuciones no justifiquen la autoría, describiendo la contribución llevada a cabo, por ejemplo, "apoyo técnico", "revisión crítica del escrito", "recolección de muestras".

Referencias

El formato está basado en la guía de estilos de la American Chemical Society (ACS).

Referencias en texto: Todas las citas que aparecen en el texto deben coincidir con las presentadas en la sección REFERENCIAS, y viceversa.

Debe evitarse citar como bibliografía:

- Los resúmenes presentados en congresos u otras reuniones.
- Comunicaciones personales.
- Datos no publicados. La citación de un artículo "en prensa" supone que el artículo ya fue aceptado para publicación.

Las citas deben realizarse con números itálicos en paréntesis en la línea del texto, y dentro de la puntuación. Por ejemplo:

- Las condiciones de extracción se encuentran reportadas en otros estudios (1).

Si hay varias citas se separan con coma (,) sin espacios entre los números; si son citas consecutivas, se separan con guión (-). Por ejemplo:

- Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados por otros autores (8, 26-30).

Las citas se deben escribir con números naturales acorde a su orden de aparición. Si dentro de la redacción del texto se debe mencionar el autor, entonces la citación debe ser:

- Un autor: Duque (2)
- Dos autores: Duque y Palomeque (3)
- Más de dos autores: Duque *et al.* (4)

Formato de referencias: Las referencias deben ser organizadas en el mismo orden numérico en el que fueron presentadas a lo largo del texto.

Revistas

Se debe anotar el apellido y las iniciales del nombre de todos los autores. Apellidos se separan de las iniciales del nombre con coma. Las iniciales de los nombres de autores se acompañan con punto. Los autores se separan con punto y coma. Luego se escribe el título. El nombre abreviado de la revista en cursiva, de acuerdo al Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI, <http://cassi.cas.org/search.jsp>). El año en negrilla, el volumen en itálica y las páginas (separadas por guión). De igual manera, si el artículo cuenta con DOI es necesario incluirlo al final de la referencia.

- Hasta seis autores: se incluyen todos los autores.

Da Silva, R.; Nissim, I.; Brosnan, M.; Brosnan, J. Creatine synthesis: Hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in the rat in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2009**, *296*, 256-261. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.90547.2008>.

- Más de seis autores: incluir hasta los seis primeros autores y a continuación escribir *et al.*

Libros y otras monografías

- Libros sin editores

- Stout, J.; Antonio, J.; Kalman, D. *Essentials of creatine in sports and health*. Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2008; pp 30-40. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-573-2>.

- Budavari, S.; O'Neil, M. J.; Smith, A.; Heckelman, P. E.; Obenchain, J. R., Jr.; Gallipeau, J. A. R.; D'Arecea, M. A. *The merck index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 13th ed. Merck & Co., Inc.: Whitehouse Station, NJ, 2001; pp 1768-1769.

- Libros con editores

- Rowe, R. C.; Sheskey, P. J.; Owen, S. C. (eds.). *Handbook of pharmaceutical excipients*, 5th ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association: Grayslake, IL, 2006; pp 798-799.

- Capítulo en libro editado

McBrien, M. Selecting the Correct pH Value for HPLC. In *HPLC made to measure: A practical handbook for optimization*; Kromidas, S., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2006; pp 89-103.

Libros y otras monografías

- Impreso

King, K. J. Development of a pressurized system for oxidation studies of volatile fluids. M.S. Thesis, The Pennsylvania State University, State College, PA, Marzo 1983.

- Electrónico

Abrams, N. M. Efficiency enhancement in dye-sensitized solar cells through light manipulation. Ph.D. Dissertation [Online], The Pennsylvania State University, University Park, PA, December 2005. <http://etda.libraries.psu.edu/theses/approved/WorldWideIndex/ETD-1061/index.html> (consultado el 2 de abril de 2014).

Sitios Web

Penn State Department of Chemistry. <http://www.chem.psu.edu/> (consultado el 7 de junio de 2014).

Mallet Chemistry Library, University of Texas Libraries. ThermoDex home page: An index of selected thermodynamic and physical property resources. <http://www.lib.utexas.edu/thermodex/> (consultado el 19 de marzo de 2014).

En prensa

Martínez, F.; Jouyban, A.; Acree, W. E., Jr. Comments on "Solubility and thermodynamic function of a new anticancer drug ibrutinib in 2-(2-ethoxyethoxy)ethanol + water mixtures at different temperatures". *J. Chem. Thermodyn.* **2015**. In press. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jct.2015.11.031>

Tablas y figuras

Las fotos, diagramas, mapas y gráficas se clasifican como figuras. Deben usarse figuras como alternativa a las tablas; evite redundancia entre tablas, figuras y texto.

Las figuras con sus leyendas deben enviarse individualmente en formato .TIFF, de excelente calidad, con una resolución mínima de 300 dpi y con uno de dos tamaños (9 cm de ancho, que es una columna, o 20 cm que cubre las dos columnas). La impresión a color no genera costos adicionales para los autores, sin embargo, representa un mayor costo para la revista. Teniendo esto en cuenta, se debe utilizar escala de grises o tramas siempre que sea posible. Deben usarse colores cuando sea estrictamente necesario. Figuras que hayan sido creadas en Excel o Word deben ser enviadas en esos programas. Las tablas deben estar en el cuerpo del artículo al final del documento. Tanto las tablas como las figuras deben ser autocontenidas (poder interpretarse sin necesidad de recurrir al cuerpo del artículo). En la leyenda de la figura, o en el título o pie de la tabla, deben describirse las claves, abreviaturas y demás explicaciones. Se recomienda proporcionar además de los promedios, las desviaciones estándar y demás información estadística relevante a los datos.

La rotulación de cada tabla debe ir a la cabeza de la misma, mientras que en las figuras debe presentarse al pie. Evite figuras pequeñas aisladas: agrupe figuras con información relacionada en figuras compuestas rotuladas con letras (Figura 1a, Figura 3b, etc.). Si un artículo contiene tablas o figuras reproducidas (así sean del mismo autor), es obligación declarar el origen y presentar permiso para utilizarlas. Es responsabilidad de los autores conseguir el correspondiente permiso. Si tiene dudas al respecto, por favor comunicarse con la revista vía correo electrónico (rcoquim_fcbog@unal.edu.co) o por teléfono (+571 3165000 Ext. 14458).

Preparación para el envío online

Antes de realizar el envío de su manuscrito ya sea por el Portal o por correo electrónico, verifique que cumple con las siguientes condiciones:

- Presenta un título en los 3 idiomas solicitados.
- Proporciona nombres y apellidos completos de los autores (e indica quién es el autor de correspondencia), y de cada autor se menciona:
 - o Último título profesional.
 - o Institución en la cual trabaja.

- o País y ciudad de residencia.
- o Correo electrónico.

- Presenta un resumen analítico, de máximo 200 palabras, en los 3 idiomas solicitados.
- Presenta palabras clave, en los 3 idiomas solicitados.
- El cuerpo del artículo se encuentra en el formato solicitado.
- Las referencias citadas en el cuerpo del artículo aparecen en la sección REFERENCIAS, y viceversa.
- El formato de las referencias sigue las indicaciones estipuladas en esta guía.
- En las referencias se menciona el DOI de los artículos, si es el caso.
- Las figuras están en formato .TIFF con resolución mayor a 300 dpi en archivos diferentes al cuerpo del documento. Si las figuras fueron creadas en Word o Excel entonces se envían en ese formato.
- Las tablas van al final del documento.
- Adjunta la carta de presentación del artículo en el formato dispuesto para tal fin.

Manuscrito aceptado para publicación

Si el Editor le ha notificado que su manuscrito podría ser aceptado para publicación en caso de tener en cuenta las modificaciones sugeridas por los revisores, envíe la nueva versión del artículo acompañada de una carta donde detalle cada uno de los comentarios de los revisores, y justifique en caso de que no tenga en cuenta alguna de las sugerencias. Trabaje la nueva versión del artículo con control de cambios o resalte los cambios en esta nueva versión, para que el Editor pueda identificarlos con facilidad.

Una vez haya finalizado el proceso de revisión por pares, el Editor enviará un correo electrónico al(os) autor(es) del manuscrito manifestando la decisión del Comité Editorial. Si el manuscrito ha sido aceptado para publicación, se adjuntarán al correo las sugerencias, indicaciones y comentarios que cada evaluador efectuó sobre los aspectos de fondo y de forma del artículo. Para continuar con el proceso de publicación el(los) autor(es) deben enviar los siguientes archivos al correo de la revista (rcolquim_fcboq@unal.edu.co):

- La nueva versión del documento en donde se trabaje con control de cambios o se resalten las modificaciones trabajadas.
- Una carta en la que se detallen cada uno de los comentarios de los revisores, justificando aquellos casos en los que no se siguió una determinada indicación o sugerencia.
- Las imágenes que se hayan modificado en virtud de los comentarios de los revisores y las necesidades de la nueva versión. Las imágenes deben estar en formato .TIFF con una resolución mayor a 300 dpi.

Costo de la publicación

La publicación de un artículo, con una extensión no mayor a 3 páginas de la revista, tendrá un costo de \$30.000 pesos colombianos. Las páginas adicionales tendrán un costo de \$20.000 pesos colombianos cada una.

Description

Revista Colombiana de Química (Rev. Colomb. Quim. Online version ISSN 2357-3791, printed version ISSN 0120-2804) is a peer-reviewed scientific journal from the Department of Chemistry, Faculty of Sciences of Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Since its launch in 1971 and until 1980 Revista Colombiana de Química published a volume per year, and its frequency changed to one or two volumes per year from 1981 to 2006. From 2007 until the present, this journal has published three volumes per year. All of its volumes are available online at the website: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/index>.

Revista Colombiana de Química is indexed in databases such as Scopus, Publindex, DOAJ, SciELO, Latindex, and Redalyc. This publication has a Scientific and Editorial Board composed of renowned researchers in each subject, and accepts relevant contributions to the different areas of chemistry such as analytical chemistry, biochemistry, organic and physical chemistry, food chemistry, inorganic chemistry, material sciences, organometallic chemistry, and chemistry teaching, among others. The target audience are professionals of any area of chemistry.

Types of manuscripts

Research articles

They are articles that present results of investigation that have not been published previously. The authors should highlight the contribution of their work to novel knowledge. It is suggested a maximum of 40 references.

Reviews

They will be requested by invitation of the Publishing Board, considering the experience of the authors in a specific subject. They are articles that present the current state of the knowledge on a subject. Additionally, in this type of articles, the authors should clearly establish their contribution and own criterion. It has to present more than 50 references, preferably of the last 5 years.

Ethics

Revista Colombiana de Química follows the ethics policy proposed by COPE: <http://publicationethics.org/> intended for peer-reviewed scientific journals. Please be aware that plagiarism, ghost writing, and duplication of results are considered to go against our ethics policy. This journal uses an evaluation system in which authors and referees are unknown to each other.

Conflicts of interest

The journal defines a conflict of interest as any subject that interfere in: the complete and objective presentation, the review by pairs, the taking of publishing decisions, or the publication of investigation articles presented to the journal. The conflict of interests can be of financial and no financial nature, professional or personal, and can come up in relation to an organization or another person.

Submitting and outline for the general review

Manuscripts submitted to the Revista Colombiana de Química for their possible publication have to be unpublished (**no subjected at the same time to any other journal, either printed or digital**). The authors are responsible for their opinions and ideas declared in the manuscript. The precision of the information in a manuscript, including figures and tables, is complete responsibility of the author (s).

Manuscripts can be submitted for their evaluation via email (rcolquim_fcbog@unal.edu.co) or through the platform on-line of the journal (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim>).

General requirements for submitting

1. Sending through the portal online are possible if the author is registered. If not, the author should register following the necessary steps. Before beginning, it is important to check that the sending meets all the requirements requested by the journal (See section Preparation for on-line sending).
2. Neither abstract nor authors' data should be included in the on-line version of the document. These information should be included in the metadata, that is to say, in the submission form. On the contrary, if the article is sent by e-mail it has to contain all the data that is specify in the Format section.
3. In both cases, on-line submitting or via e-mail, a letter presenting the article must be submitted. This letter should include the most relevant aspects of the manuscript, a list of three possible reviewers, with their respective contact data. The letter should be sign by all the authors.
4. Photos, diagrams, maps, and figures should be named as figures. Photos and maps should be attached in a separated file, in a TIFF or JPEG format. They should have the size at which they have to be published, with a resolution of 300 dpi, and in a grey scale in black and white. If a grey scale is not good enough then different trams should be used. Photos and maps should not be copied in Word because they lose resolution, and therefore there will be problems during the formatting. If the graphic corresponds to archives developed in Excel or Word, then authors should send it in the original program.

Reviewing flow

- After receiving the manuscript and verifying that it fulfils with the format established in this guide, it is sent to peer-reviewers.
- After receiving the evaluations, the decision of the Editorial Board is sent to the correspondence author:
 - o **Accepted with minor changes:** Authors should send a new version to the journal. When the editor verifies that the changes were made (the authors have to send a detailed list with the changes made or the reason why they do not made the changes), the article is accepted.
 - o **Major changes:** Authors should send a new version to the journal, which will be subjected to a fast evaluation (the authors have to send a detailed list with the changes made or the reason why they do not made the changes).
 - o **Rejected:** The authors decide if they subject a new version to the journal, which will be treated as a new article.
- If the article is accepted, it will appear initially in a pre-print format in the web page of the journal (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/index>). Later on it will be replaced by the diagramed version.

Preparation

The document has to be presented in a Word .doc or .docx file, size letter, 2.0 line spacing, with top and bottom margins of 2.5 cm and 3.0 cm in right and left margins, font Times New Roman, pages consecutively numbered. The titles: **ABSTRACT, RESUMEN, RESUMO, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS AND DISCUSSION, CONCLUSIONS, ACKNOWLEDGEMENTS, and REFERENCES** should to be used.

Language

Manuscripts are accepted in Spanish, English or Portuguese. However, **the title, abstract, and key words should be written in the three languages**. As a strategy to increase the diffusion and visibility of the manuscript, the journal encourage to the authors to present the manuscript in English.

First page

Title

The title has to be in small letter, unless the capital is compulsory. It has to be concise but informative and does not have to exceed 120 characters including spaces. The title has to appear always in Spanish, English, and Portuguese. For example:

- Catalytic oxidation of toluene and 2-propanol over Mn and Co mixed oxides obtained by coprecipitation method.
- Oxidación catalítica de tolueno y 2-propanol sobre óxidos mixtos de Mn y Co obtenidos por coprecipitación.
- A oxidação catalítica de tolueno e 2-propanol em óxidos mistos de Mn e de Co, obtidos por coprecipitação.

Author(s) and their filiations

- Full names.
- Last professional title.
- Working institution.
- Country and city of residence.
- E-mail (for each author).

Filiation data should keep a categorical order as follows: laboratory, institute, university, city, state, country, e-mail. Each filiation should be listed with numbers in superscript and referenced to each author. The author of correspondence has to be denoted with an asterisk. For example:

Mauricio Acelas¹, Elizabeth Gil², Markus Doerr³, Martha Daza³, Juan Manuel Urbina^{1*}

¹Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular - LQOBio, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Ciudad Universitaria, AA 678, Bucaramanga, Colombia.

²Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 N° 43-82, Bogotá D.C., Colombia.

³Grupo de Bioquímica Teórica - GBQT, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Ciudad Universitaria, AA 678, Bucaramanga, Colombia.

* Author of correspondence: jurbina@uis.edu.co

Body of the manuscript

The manuscript should be justified (aligned to both left and right), with the pages and lines numbered continuously. All titles and primary and secondary subtitles should be justified to the left. The titles (**ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIAL AND METHODS, RESULTS AND DISCUSSION, CONCLUSIONS, ACKNOWLEDGEMENTS, and REFERENCES**) have to go with capital letter and bold type. The primary subtitles have to go with small letter sustained and bold type. The secondary subtitles have to go in italic. Always the statistics terms, abbreviations, and symbols have to be defined the first time they are used in the manuscript. For the measurement units, the International Metric System should be used.

When not followed by units numbers are written up to ten with the word (one, two, three, etc.) and higher than ten with numbers (11, 12, 102). Numbers with units should be followed by the units keeping a space between one and another (100 m, 50 mL). If the number represents a percentage then there should not be any space between the number and the unit (80%). In manuscripts written in Spanish decimals are separated by comma (,) and in English by point (.). Each figure and table in the text must be quoted according to the order of apparition and in the following format: Figure 1 or Figures 1 and 2 or Figures 1A-1F or Table 1.

Abstract

Abstract should have a maximum of 200 words. To write an introductory sentence is suggested. The authors have to mention the aim of the investigation, the notable results (providing specific data and, if possible, its statistical significance), and the main conclusions without bibliographic references. Authors should emphasize towards the new and important aspects of the study. A descriptive abstract should be avoided (where no data is shown), instead, an analytical abstract (where notable data obtained in the investigation is shown) should be presented. The abstract has to appear always in Spanish, English, and Portuguese.

Key words

Between three to six words have to be listed. The words used in the title of the manuscript should not be used in this section. Key words have to appear always in Spanish, English, and Portuguese.

Introduction

The logical foundations for the realization of the work have to be presented. Only strictly timely references should be given. Data or conclusions of the manuscript should not be included in this section. At the end of the introduction, the aim of the work have to be shown.

Materials and methods

In a subsection, the reagents used, trade, and the country have to be listed. The methods used should be listed by subtitles. The procedures have to have the sufficient detail to allow other professionals to reproduce the experiments. This section must include the equipment, including name of the manufacturer and country, in addition, the references of the methodology and statistical methods should be provided. Authors should describe the new methods or those that have been substantially modified, supporting the reasons to use them and evaluating their limitations.

Authors submitting reviews should describe the methods employed to locate, select, extract, and synthesize the information. If statistical tests are done, then a subtitle "Statistical analysis" should be included for their description.

Results and discussion

Results should be presented in a logical order and in accordance to the order presented in the MATERIALS AND METHODS section. Authors should highlight the results that contribute to the generation of new knowledge. The information contained in tables does not have to be repeated in figures, and vice versa.

New and outstanding outcomes of the study should be highlighted. Information presented in the sections INTRODUCTION should not be shown again in this section. It is advised to evaluate possible relations between the obtained results, to judge the results in relation with the ones obtained by other authors, and to propose hypotheses to explain the obtained data. The sections should have a minimum extension of three pages written in double space.

Conclusions

Minimum one paragraph should be presented as conclusion (s). Conclusions should be in accordance to the aim of the study, avoiding to enumerate them or to present them as loose sentences. Author should present the conclusions well supported by the data.

Acknowledgements

Funding sources should be mentioned in this section. Support received for the realization of the study (e.g., scholarships, equipment, reagents) should also be included. Authors can appoint those people that contributed to the work, but whose contributions do not justify the authorship, describing the contribution carried out, for example, "technical support", "critical review of the writing", "collecting samples".

References

The format is based in the guide of styles of the American Chemical Society (ACS).

References in text: All the appointments that appear in the text have to coincide with those presented in the section REFERENCES, and vice versa.

Authors must avoid referencing as bibliography:

- The summaries presented in congresses or other meetings.
- Personal communications.
- Unpublished data. The citation of a manuscript as "in press" supposes that it was already accepted for publication.

The references should appear with italic numbers in parentheses in the line of the text, and inside the punctuation. For example:

- The conditions of extraction are reported in other studies (1).

If there is more than one reference there must be separated by comma (,) without spaces between numbers. If they are consecutive references they are separated by hyphen. For example:

- The results obtained were similar to those reported by other authors (8, 26-30).

The references should be written with natural numbers in accordance to their order of apparition. If within the text the author(s) are to be mentioned, then the citation has to be as:

- An author: Duque (2)
- Two authors: Duque y Palomeque (3)
- More than two authors: Duque *et al.* (4)

Format of references: The references have to be organized in the same numerical order in which they were presented along the text.

Journals

The surname and the initials of the name of all the authors have to be included. Surnames should be separated of the initials of the name by comma. The initials of the names of authors should be accompanied with point. Authors should be separated with semicolon. After the authors information the title should be written. The name abbreviated of the journal in italic, according to the Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI, <http://cassi.cas.org/search.jsp>). The year in bold type, the volume with italic type and the pages (separated with hyphen). If available the DOI should be included.

- Up to six authors: all the authors should be included.

Da Silva, R.; Nissim, I.; Brosnan, M.; Brosnan, J. Creatine synthesis: Hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in the rat in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2009**, *296*, 256-261. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.90547.2008>.

- More than six authors: include until the sixth author and then write *et al.*

Books and other monographs

- Books without editors
 - Stout, J.; Antonio, J.; Kalman, D. *Essentials of creatine in sports and health*. Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2008; pp 30-40. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-573-2>.
 - Budavari, S.; O'Neil, M. J.; Smith, A.; Heckelman, P. E.; Obenchain, J. R., Jr.; Gallipeau, J. A. R.; D'Arecea, M. A. *The merck index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 13th ed. Merck & Co., Inc.: Whitehouse Station, NJ, 2001; pp 1768-1769.
- Books with editors
 - Rowe, R. C.; Sheskey, P. J.; Owen, S. C. (eds.). *Handbook of pharmaceutical excipients*, 5th ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association: Grayslake, IL, 2006; pp 798-799.
- Chapter in edited book
 - McBrien, M. Selecting the Correct pH Value for HPLC. In *HPLC made to measure: A practical handbook for optimization*; Kromidas, S., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2006; pp 89-103.

Doctoral Thesis (or similar)

- Printed
 - King, K. J. Development of a pressurized system for oxidation studies of volatile fluids. M.S. Thesis, The Pennsylvania State University, State College, PA, March 1983.
- Online
 - Abrams, N. M. Efficiency enhancement in dye-sensitized solar cells through light manipulation. Ph.D. Dissertation [Online], The Pennsylvania State University, University Park, PA, December 2005. <http://etda.libraries.psu.edu/theses/approved/WorldWideIndex/ETD-1061/index.html> (consulted on the 2nd April 2014).

Web sites

Penn State Department of Chemistry. <http://www.chem.psu.edu/> (consulted on the 7th June 2014).

Mallet Chemistry Library, University of Texas Libraries. ThermoDex home page: An index of selected thermodynamic and physical property resources. <http://www.lib.utexas.edu/thermodex/> (consultado el 19 de marzo de 2014).

In press

Martínez, F.; Jouyban, A.; Acree, W. E., Jr. Comments on "Solubility and thermodynamic function of a new anticancer drug ibuprofen in 2-(2-ethoxyethoxy)ethanol + water mixtures at different temperatures". *J. Chem. Thermodyn.* **2015**. In press. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jct.2015.11.031>

Tables and figures

Photos, diagrams, maps, and graphics should be mentioned as figures. We encourage authors to present data in figures instead of tables. In any case, redundancy among tables, figures, and text should be avoided.

Figures with legends have to be sent individually in format .TIFF, of excellent quality, with a minimum resolution of 300 dpi and with one of two sizes (9 cm of width, that is a column, or 20 cm that covers the two columns). The color impression does not generate additional costs for the authors, however, it represents a greater cost for the journal. With this in mind, a scale of grey or tints should be used whenever possible. The use of color might be considered when it is strictly necessary. Figures originally created in Microsoft Word or Excel should be sent in that program.

Tables should be included in the body of the manuscript at the end of the document. Both tables and figures have to be self-contained (They should be interpreted without needing information from the body of the manuscript). Keys and abbreviations should be described in the legend of the figure and in the title or foot of the table. It is advised to provide in addition to the average, the standard deviation, and other notable statistical information.

The labels of each table have to be at the top of it, whereas in figures the labels have to be presented at their foot. Small figures should be avoided: group figures with information related in compound figures entitled with letters (Figure 1a, Figure 3b, etc.). If a manuscript contains tables or figures reproduced (even if they are from the author (s) submitting the manuscript) it is compulsory to the authors to declare the origin and to present permission to use them. It is responsibility of the authors to achieve the corresponding permission. In case of any doubt in this regard, please contact the journal via e-mail (rcolquim_fcbog@unal.edu.co) or by telephone (+571 3165000 Ext. 14458).

Preparation for on-line submitting

Before sending your manuscript, by the Portal or by email, verify that it fulfils with the following conditions:

- It has a title in the 3 languages requested.
- It provides full names of the authors, and for each one it is mentioned:
 - o Last professional title.
 - o Institution in which the author works.

- o Country and city of residence.
- o E-mail.

- It presents an analytical abstract, of maximum 200 words, in the three languages requested.
- It presents keywords, in the 3 languages requested.
- The body of the article follows the format requested.
- The cited references in the body of the article appear in the section REFERENCES and vice versa.
- The format of the references follows the indications stipulated in this guide.
- In the references the DOI of the articles are presented, if it is the case.
- The figures are in format .TIFF with resolution greater than 300 dpi. (in separated files). If a figure was created in Word or Excel then sent it in that format.
- The tables are placed at the end of the document.
- A letter presenting the manuscript in a format as suggested above is included. Available in <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim>

Manuscript accepted for publication

If the Editor has notified the correspondence author that his (her) manuscript could be accepted for publication in case the modifications suggested by the referees are taken into account, the author should send the new version of the manuscript accompanied of a letter detailing the response to each one of the comments. In the case a comment is not taken into account the author should justify the reason. The new version of the manuscript should be created with the “track changes” option or highlighting in yellow the changes, so that the Editor can identify them easily.

Once the process of reviewing is completed, the Editor will send an email to the correspondence author manifesting the decision of the Editorial Board. If the manuscript is accepted for publication, an e-mail attaching the suggestions, indications, and comments of each reviewer will be sent to the correspondence author. To continue with the process of publication, the author should send the following archives to the email of the journal (rcolquim_fcbog@unal.edu.co):

- The new version of the manuscript in which the author uses the option “track changes” or highlight in yellow the modifications performed.
- A letter detailing the response to each one of the comments. In the case a comment is not taken into account the author should justify the reason.
- In the case that a reviewer suggest that a figure should be modified, then be aware that it should be in format .TIFF with a resolution greater than 300 dpi.

Cost of the publication

The publication of a manuscript with an extension up to three pages of the journal will have a cost \$30,000 Colombian pesos. Additional pages will cost of \$20,000 Colombian pesos each one.

Contenido

Carta del editor
Editor's letter

1-4

Química Orgánica y Bioquímica

Determinación del contenido extra e intracelular de algunas enzimas líticas relacionadas con pared celular en raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.)

Determination of extra and intracellular content from some lytic enzymes related with carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) root cell wall

Determinação do conteúdo extra e intracelular de algumas enzimas líticas relacionadas com a parede celular em raízes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.)

Edilene Ramirez, Sivia T. Martinez

5-11

Química Aplicada y Analítica

Implementación y evaluación de una nariz electrónica para la detección de alcoholes lineales

Implementation and evaluation of an electronic nose for the alcohols detection
Implementação e avaliação de um nariz eletrônico para detectar álcoois lineares

Ana Lucía Paredes-Doig, María del Rosario Sun Kou, Gino Picasso-Escobar, Elizabeth Doig-Camino, Germán Comina

12-18

Caracterización química de material particulado PM₁₀ en la atmósfera de La Guajira, Colombia

Chemical characterization of particulate matter PM₁₀ in Guajira, Colombia atmosphere
Caracterização química do material particulado PM₁₀ na atmosfera da Guajira, Colombia

Carlos Doria Argumedo, Juan Fagundo Castillo

19-29

Nanostructured MnO₂ catalyst in *E. crassipes* (water hyacinth) for indigo carmine degradation

Catalizador de MnO₂ nanoestructurado en *E. crassipes* (jacinto de agua) para la degradación de indigo carmin
Catalisador de MnO₂ nanoestructurado em *E. crassipes* (jacinto da água) para a degradação do indigo carmin

Tatiana Cuervo Blanco, César A. Sierra, Hugo R. Zea

30-38

Microencapsulación mediante secado por aspersión de aceite de mora (*Rubus glaucus*) extraído con CO₂ supercrítico

Microencapsulation by spray drying of blackberry (*Rubus glaucus*) oil extracted with supercritical CO₂
Microencapsulação por secagem por atomização de óleo de amora (*Rubus glaucus*) extraído com CO₂ supercrítico

Paola M. Figueroa, Miguel A. Ceballos, Andrés M. Hurtado

39-47

Caracterización de los compuestos del aroma en rones colombianos por HS-SPME-GC-MS-O

Characterization of aroma compounds in Colombian rums by HS-SPME-GC-MS-O
Caracterização de compostos de aroma em rum colombiano por HS-SPME-GC-MS-O

Jazmin Osorio Monsalve, Carlos López, Julián Zapata

48-54

Guía para autores
Guide for authors

55-64

La Revista Colombiana de Química (Rev.Colomb.Quim) se encuentra indexada y referenciada en: Publindex-Índice Bibliográfico Nacional (categoría A2 - dic 2013); Chemical Abstracts; SciELO Colombia; Scopus Q4 (SIR/2013: 0,112); Latindex; Redalyc y Directory of Open Access Journals (DOAJ).

Es publicada cuatrimestralmente por el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Se orienta a la divulgación científica de contribuciones provenientes de la investigación en las diversas áreas de la química.

Open Access Journal: full contents available on-line at:

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcq/colquim>

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0120-2804&lng=es&nrm=iso

