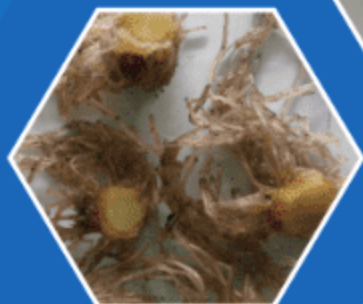




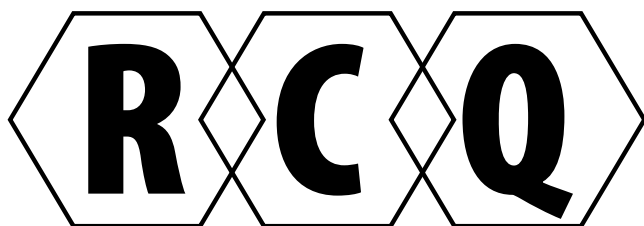
# Revista Colombiana de Química

Volumen 46, nro. 2 de 2017/ ISSN 0120-2804

Condiciones para el análisis  
electroforético de proteínas  
apoplásticas de tallos y raíces  
de clavel  
(*Dianthus caryophyllus* L)  
para estudios proteómicos

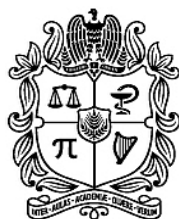


UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA  
SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



# Revista Colombiana de Química

Volumen 46, No. 2, mayo - agosto de 2017



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  
REDIB  
Directory of Open Access Journals (DOAJ)

## Periodicidad

Cuatrimestral

## Contacto

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

## Consulta Open 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](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0120-2804&lng=es&nrm=iso)

## Director Revista

Carlos Eduardo Narváez 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.  
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](mailto:biblioteca_bog@unal.edu.co) ó [cevelascozaza@unal.edu.co](mailto: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

4

## Química Orgánica y Bioquímica

Condiciones para el análisis electrofóretico de proteínas apoplásticas de tallos y raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) para estudios proteómicos  
Electrophoretic conditions for analysis of apoplastic proteins in stems and roots of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) for proteomic studies  
Condições para a análise eletroforética de proteínas apoplásticas de caules e raízes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) para estudos proteômicos  
Ana P. Martínez, Sixta T. Martínez, Harold D. Ardila

5-16

## Química Aplicada y Analítica

Evaluación del efecto protector contra la oxidación lipídica de fracciones obtenidas a partir del epicarpio de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Sendtn)  
Evaluation of protective effect against lipid oxidation of fractions obtained from tree tomato (*Solanum betaceum* Sendtn) epicarp  
Avaliação do efeito protetor contra oxidação lipídica de frações obtidas a partir da casca de tomate de árvore (*Solanum betaceum* Sendtn)  
Henry I. Castro-Vargas, Fabián Parada-Alfonso

17-23

Desarrollo y validación de un método multiresiduo para el análisis de plaguicidas en miel por UFLC-MS  
Development and validation of a multiresidue method for pesticide analysis in honey by UFLC-MS  
Desenvolvimento e validação de um método de resíduos múltiplos para o análise de agrotóxicos em mel por UFLC-MS  
Adriana M. Zamudio S., Nicolás Vanoy V., Consuelo Díaz-Moreno, Diego A. Ahumada F.

24-36

Metales pesados (Cd, Cu, V, Pb) en agua lluvia de la zona de mayor influencia de la mina de carbón en La Guajira, Colombia  
Heavy metals (Cd, Cu, V, Pb) in rainwater in the most influence area of the coal mine in La Guajira, Colombia  
Metais pesados Cd, Cu, V, Pb) na água de chuva na área de influência da mina de carvão em La Guajira, Colômbia  
Carlos Doria Argumedo

37-44

Evaluación de métodos de extracción para la obtención del ácido giberélico en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.)  
Comparison of different extraction methods for gibberelic acid obtention from corn (*Zea mays* L.) germinated seeds  
Avaliação de diferentes metodologias de extração para a obtenção do ácido giberélico em sementes germinadas de milho (*Zea mays* L.)  
Juan David Rivera, Yaned Milena Correa, Juan Pablo Penagos

45-50

## Fisicoquímica y Química Inorgánica

Nanopartículas de paladio soportadas en hidroxisales laminares: uso potencial en reacciones de Sonogashira  
Palladium nanoparticles supported in laminar hydroxide salts: potential use in Sonogashira reactions  
Nanopartículas de paládio suportadas em hidroxisais laminares: uso potencial em reações de Sonogashira  
Cristian Camilo Giraldo Londoño, Rogelio Ocampo-Cardona, Luz Amalia Ríos Vásquez, Maby Moll Martínez Garzón, Jhon Mauricio Aguirre Cortés

51-65

Guía para autores  
Guide for authors

66-73

El segundo número del volumen 46 del año 2017 de la Revista Colombiana de Química cuenta con la participación de autores de distintas universidades e instituciones colombianas. Las contribuciones provienen de autores de la Universidad Nacional, la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, el Instituto Nacional de Metrología de Colombia, la Universidad de La Guajira y la Universidad de Caldas. A continuación se presenta el contenido del número.

La sección de Química Orgánica y Bioquímica cuenta con un artículo. En este se obtuvieron extractos apoplásticos de tallos y raíces de claveles para usarlos en estudios proteómicos. Se evaluaron parámetros para la extracción óptima de las proteínas y logró establecerse un protocolo que puede aplicarse a otras especies vegetales.

La sección de Química Aplicada y Analítica cuenta con cuatro artículos, en el primero de ellos se evaluó el efecto protector que ejerce el epicarpio de tomate de árbol sobre la carne de res cocida, inhibiendo su oxidación lipídica. Se obtuvieron extractos de epicarpio mediante extracción supercrítica y fraccionamiento por extracción en fase sólida, el efecto protector se evaluó por medio de comparación con un producto sintético. Por medio de HPLC se identificaron algunos de los compuestos antioxidantes presentes en este tipo de residuo. El segundo artículo propuso y verificó mediante una validación tipo 2, un método para analizar 56 residuos de pesticidas en miel por UFLC-MS. Se partió del método QuEChERS y se optimizó modificando diferentes parámetros. Se logró desarrollar un método apto para analizar el 89% de los plaguicidas analizados, con porcentajes de recuperación entre 70 y 120 y coeficientes de variación menores al 15%.

El tercer artículo de la sección evalúa la concentración de metales pesados (Cu, Cd, V y Pb) en el agua de lluvia de la región de influencia de la zona carbonífera de La Guajira colombiana. La concentración de los metales se midió mediante espectrometría de absorción atómica, las medidas se tomaron a lo largo de un año. Se encontró que la atmósfera no se encuentra contaminada con Pb, pero sí con los otros metales analizados, de modo que el agua lluvia no es apta para el consumo humano. El cuarto artículo compara dos métodos de extracción empleados en la obtención de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en semillas germinadas de maíz: extracción sólido-líquido y DSASE. Mediante el último se obtuvo la mayor concentración de GA<sub>3</sub>, al ser medida por HPLC-DAD.

Finalmente, la sección de Fisicoquímica y Química Inorgánica cuenta con un artículo en que se sintetizan dos tipos de nanopartículas de paladio metálico soportadas en hidroxisales de acetato de zinc o de laurilsulfato de sodio. Después de la síntesis se evaluaron ambos tipos de nanopartículas como catalizadores en la reacción de Sonogashira, partiendo de fenilacetileno y yodobenceno, o fenilacetileno y 2-yodofenol para dar lugar a difenilacetileno (32% de rendimiento) o 2-fenilbenzofurano (18% de rendimiento), respectivamente.

The second issue of volume 46 of the year 2017 of Revista Colombiana de Química counts on the participation of authors from different universities and Colombian institutions. The contributions come from authors of Universidad Nacional de Colombia, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Instituto Nacional de Metrología de Colombia, Universidad de La Guajira, and Universidad de Caldas. The contents of the number are shown below.

The section of Organic Chemistry and Biochemistry has an article. In it, apoplasic extracts of stems and roots of carnations were made for their use in proteomic studies. Parameters for the optimal proteins extraction were evaluated and a protocol that can be applied to other plant species was established.

The section of Applied and Analytical Chemistry has four articles, in the first of them the protective effect against lipid oxidation on cooked beef meat exerted by tamarillo epicarp was evaluated. Extracts of epicarp were obtained by supercritical extraction and fractionated by solid phase extraction, the protective effect was evaluated by comparison with a synthetic product. By means of HPLC some of the antioxidant compounds present in this residue were identified. The second article proposed and verified, by a type 2 validation, a method to analyze 56 pesticide residues in honey by UFLC-MS. The initial method was QuEChERS, it was optimized by modifying different parameters. It was possible to develop a suitable method to analyze 89% of the pesticides studied, with recovery ranging between 70 and 120% and coefficients of variation lower than 15%.

The third article of the section evaluated the concentration of heavy metals (Cu, Cd, V and Pb) in rainwater of the coal area influence region of La Guajira, Colombia. The concentration of the metals was measured by atomic absorption spectrometry, measurements were taken over a year. It was found that the atmosphere is not contaminated with Pb, but with the other metals, so that rainwater is not suitable for human consumption. The fourth article compared two extraction methods used to obtain gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) in germinated corn seeds: solid-liquid extraction and DSASE. The latter allowed to obtaining the highest concentration of GA<sub>3</sub>, as measured by HPLC-DAD.

Finally, the section of Physical Chemistry and Inorganic Chemistry has an article in which two types of metal palladium nanoparticles supported on hydroxysalts of zinc acetate or sodium lauryl sulfate were synthesized. After synthesis, both types of nanoparticles were evaluated as catalysts in the Sonogashira reaction, starting from phenylacetylene and iodobenzene, or phenylacetylene and 2-iodophenol to give diphenylacetylene (32% yield) or 2-phenylbenzofuran (18% yield), respectively.



Ana P. Martínez<sup>1\*</sup>, Sixta T. Martínez<sup>1</sup>, Harold D. Ardila<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación Estudio de Actividades Metabólicas Vegetales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Bogotá, Colombia. Cra. 30 #45-03, edificio 451. Tel: 3165000. Código postal: 111321.

\*Autor para correspondencia: apmartinezg@unal.edu.co

Recibido: 13 de Octubre de 2016. Aceptado: 14 de Febrero de 2017.

## Condiciones para el análisis electroforético de proteínas apoplásticas de tallos y raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) para estudios proteómicos

### Resumen

En el presente estudio se describe un flujo de trabajo que puede ser aplicado a diferentes especies vegetales, con el fin de obtener extractos apoplásticos que puedan ser usados para análisis proteómicos. Para ello, usando tallos y raíces de clavel, se evaluaron parámetros claves para la extracción de estas proteínas. Se determinó que para esta especie (*Dianthus caryophyllus* L.) se debe usar la solución amortiguadora fosfato de sodio 0,1 M pH 6,5, cloruro de sodio 50 mM y 0,1%  $\beta$ -mercaptoetanol para la infiltración; con tres tiempos de vacío de 20 s a 70 kPa y centrifugación a 1000 x g durante 20 min a 4 °C, seguido de precipitación y concentración de proteínas con el método Ácido tricloroacético/acetona. Bajo estas condiciones, se obtienen extractos que permiten análisis electroforéticos en 2D de proteínas de apoplasto, usando para el isoelectroenfoque tiras con gradientes de pH 5-8 para raíz y pH 3-10 para tallo. Las condiciones descritas permitirán profundizar sobre el papel de las proteínas apoplásticas en diversidad de fenómenos biológicos que involucren esta especie vegetal.

**Palabras clave:** fluido apoplástico, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, planta-patógeno, electroforesis.

## Electrophoretic conditions for analysis of apoplastic proteins in stems and roots of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) for proteomic studies

### Abstract

In the present study a workflow, that can be applied to different plant species, to obtain a high quality apoplastic extract and for proteomic analysis is described. For that, using carnation roots and stems, some important parameters for the extraction of these proteins were evaluated. The best conditions for the infiltration were provided by using a 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.5, 50 mM sodium chloride and  $\beta$ -mercaptoethanol 0.1%, with 3 vacuum times at 70 kPa for 20 s and centrifuged at 4°C at 1,000 g for 20 min, and then a subsequent protein precipitation and concentration with the Trichloroacetic acid/acetone protocol. These conditions can be used to obtain a good quality extract for 2D electrophoretic analysis of apoplastic proteins. Strips with pH gradients between 5-8 and 3-10 were used to run isoelectric analysis for extracts obtained from apoplast in roots and stems, respectively. The conditions described can be used to perform studies focused on apoplastic proteins and its role in biological phenomena involving this plant species.

**Keywords:** apoplastic fluid, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, plant-pathogen, electrophoresis.

## Condições para a análise eletroforética de proteínas apoplásticas de caules e raízes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) para estudos proteômicos

### Resumo

No presente estudo, é descrito um fluxo de trabalho que pode ser aplicado a espécies vegetais diferentes, para obter extratos apoplásticos que podem ser utilizados para análise proteômica. Para isto, utilizando os caules e as raízes do cravo, foram avaliados parâmetros considerados chave para a extração destas proteínas. Foi determinado que para esta espécie, deve ser utilizada uma solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M pH 6,5 com cloreto de sódio 50 mM e 0,1%  $\beta$ -mercaptoetanol para a infiltração; com três aplicações de vácuo de 20 s a 70 kPa e centrifugação a 1000 x g por 20 minutos a 4°C, e subsequente precipitação e concentração de proteínas usando Ácido tricloroacético/acetona. Nestas condições se podem obter extratos que permitem a análise eletroforética 2D de proteínas do apoplasto utilizando para a focalização isoeletrica tiras com gradientes de pH 5-8 para a raiz e de pH 3-10 para o caule. As condições descritas permitirão aprofundar sobre o papel das proteínas apoplásticas numa diversidade de fenómenos biológicos que envolvem esta espécie de planta.

**Palavras-Chave:** Fluido apoplástico, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, patógeno de planta, eletroforese.

## Introducción

El apoplasto de la planta, compuesto por la matriz de la pared celular y los espacios intercelulares, juega un papel importante en una amplia gama de procesos fisiológicos: interacción celular, transporte de agua y nutrientes, interacciones planta-patógeno, percepción y transducción de señales ambientales, entre otros (1, 2). La llegada de los fitopatógenos al apoplasto vegetal es una fase crítica en la mayoría de las enfermedades infecciosas, pues es donde se presentan los primeros eventos que determinan la susceptibilidad o la resistencia (1). Durante la activación de los mecanismos de defensa de las plantas, se requiere la regulación de una amplia variedad de proteínas que están implicadas en el fortalecimiento de la pared celular y en diversos niveles de la percepción y degradación de patógenos. La regulación fina de dichas proteínas presentes en el apoplasto de la planta es esencial para una rápida y efectiva percepción del patógeno, lo que conduce a mantener la integridad de la pared celular de la planta (3-5).

Sin embargo, aunque es evidente la importancia del proteoma apoplástico durante una interacción planta-patógeno dada, este permanece pobremente caracterizado en comparación con el proteoma intracelular. Esto se debe especialmente a la dificultad para obtener suficiente fluido apoplástico, sin romper la membrana celular y sin la contaminación con proteínas citoplasmáticas (1). Considerando que los estudios sobre el cambio dinámico de la composición de proteínas del apoplasto han generado nuevo conocimiento acerca de la respuesta de las plantas al estrés biótico (3, 6), se requiere de protocolos adecuados para la extracción del fluido apoplástico en aquellas especies vegetales que son abordadas por primera vez en este tipo de estudios.

Lo anterior es aún más determinante cuando se pretende aplicar técnicas de separación de proteínas altamente resolutivas, basadas en aproximaciones holísticas propias de los estudios proteómicos, en donde la contaminación con proteínas citoplasmáticas puede generar confusión durante la interpretación de resultados. Durante este tipo de análisis, se debe evitar la contaminación con componentes no proteicos que puedan interferir con las técnicas de separación e identificación de proteínas como electroforesis bidimensional en gel (2 DE) con posterior análisis por espectrometría de masas (MS) o cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). La técnica más empleada para la extracción del fluido apoplástico está basada en la combinación de tres factores: i) vacío, ii) infiltración y iii) centrifugación. Este método posee dos pasos decisivos: la infiltración con vacío, donde se emplea una solución apropiada, y la centrifugación (7-9).

Debido a que la solubilidad de las proteínas depende de diversos factores como la temperatura, la constante dieléctrica del medio, el pH, la fuerza iónica y la presencia de agentes reductores, diferentes soluciones de infiltración han sido utilizadas para la obtención de fluido apoplástico en diversas especies vegetales, entre las que se encuentran agua (10), ácido ascórbico 20 mM/CaCl<sub>2</sub> 20 mM (11), sorbitol 100 mM (12), solución amortiguadora Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 (13), solución amortiguadora fosfato de sodio 100 mM (14), NaCl 50 mM (15) o solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM pH 8,0 NaCl 3,5% p/v y β-mercaptoetanol 0,1% v/v (5). En el presente estudio se evaluaron parámetros como pH (empleando Tris-HCl pH 8,0 y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,5), fuerza iónica (NaCl 0,5 mM y 0,6 M), así como el efecto de la adición de un agente reductor como el β-mercaptoetanol.

En cuanto a la velocidad de centrifugación, se ha determinado que, empleando hojas de diversas especies de plantas, un incremento en la fuerza de centrifugación puede conducir a la contaminación con proteínas citoplasmáticas. De acuerdo a dichos estudios se determina que si la fuerza de centrifugación no excede las 1000 g, la contaminación citoplasmática es despreciable (8).

Los análisis de proteínas apoplásticas son dispendiosos teniendo en cuenta la baja concentración de proteínas que se presentan en los fluidos obtenidos bajo las técnicas reportadas (1, 4, 15). Es por ello que se hace necesario usar diferentes técnicas de precipitación que además de concentrar las proteínas, permiten la eliminación de interferentes que pueden afectar la separación electroforética posterior. Para ello se han reportados diferentes métodos que incluyen la precipitación usando diferentes solventes y soluciones salinas (4, 15-19). Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la matriz vegetal a estudiar, estos pueden causar pérdida de proteína debido a la cantidad de pasos experimentales implicados o a la pérdida de solubilidad en la fase final de disolución. Es por ello que se deben evaluar las condiciones más convenientes teniendo en cuenta la matriz vegetal objeto de estudio.

Los análisis comparativos de proteínas usando técnicas altamente resolutivas se han convertido en una de las herramientas más importantes durante los análisis proteómicos en plantas. Dentro de estas se incluyen la técnica de electroforesis en dos dimensiones (2DE), la cual ha permitido el estudio de proteínas apoplásticas en diferentes especies vegetales (1, 4, 5, 15, 20, 21). Es por ello que, con el fin de determinar algunas de las condiciones más relevantes que se deben tener en cuenta para el análisis mediante esta técnica en el caso del apoplasto del clavel, se evaluó el efecto que tiene la cantidad de proteína y el uso de diferentes rangos de pH en la separación durante la primera dimensión, sobre el número de manchas *spots* y la resolución de los mismos. Si bien es cierto que el uso de gradientes de pH más estrechos aumentan la resolución y facilitan los estudios comparativos, usar estos rangos puede obviar información relevante para la especie vegetal objeto de estudio, dependiendo de las proteínas contenidas en la muestra.

En este estudio, se describe el flujo de trabajo para la selección de las condiciones experimentales más adecuadas para el análisis de proteínas presentes en el apoplasto de raíces y tallos de clavel, incluyendo tanto las condiciones de extracción de fluido apoplástico, como las usadas para análisis electroforéticos de alta resolución (electroforesis en 1D y 2D, por ejemplo). Para ello, se evaluaron diferentes condiciones: selección de la solución de infiltración en la obtención del fluido apoplástico, selección del método de precipitación de proteínas y selección de condiciones para electroforesis en 1D SDS-PAGE y 2D IEF-SDS-PAGE. Estas condiciones experimentales podrán ser empleadas posteriormente en análisis proteómicos para la identificación de proteínas relacionadas con resistencia al marchitamiento vascular generado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod), patógeno que causa las mayores pérdidas económicas en el cultivo de esta flor. Así mismo, este flujo de trabajo propuesto puede ser usado para la selección de condiciones experimentales en el estudio inicial de las proteínas del apoplasto en otras especies vegetales.

## Materiales y métodos

### Material Vegetal

Se emplearon tallos y raíces de esquejes indexados de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), libres de patógenos, con tres a cuatro semanas de enraizamiento de la variedad Golem y de la variedad Gran Slam, donados por la empresa Florval S.A.S-Sede QFC (Gachancipá- Cundinamarca, Colombia).

### Preparación del inóculo de *Fod*

El hongo aislado empleado en este experimento fue previamente revivificado en la variedad de clavel-Solex que es altamente susceptible al marchitamiento vascular generado por *Fod*. Este microorganismo se cultivó en PDA (Papa Dextrosa Agar, Merck) durante cinco días. Dos cm<sup>2</sup> del medio colonizado por el hongo se transfirieron a medio líquido Czapek-Dox-Broth (Fluka); la suspensión resultante permaneció en agitación durante cinco días a 200 rpm y 25 °C. Posteriormente, se filtró en condiciones asépticas para retirar el micelio del sobrenadante y se llevó a una concentración  $1 \times 10^6$  conidias/mL (por conteo con el hematocitómetro).

### Inoculación del material vegetal con el patógeno

La inoculación de los esquejes se realizó de acuerdo con las condiciones establecidas en Higuera (22). Los esquejes control y los inoculados se sembraron y mantuvieron bajo las mismas condiciones por los días de duración del ensayo: con riego de agua por aspersión, bajo condiciones constantes de temperatura, radiación fotosintéticamente activa y humedad relativa (22).

### Selección de las condiciones de extracción del fluido apoplástico de clavel

La extracción del fluido apoplástico de clavel fue realizada empleando la técnica de infiltración con vacío-centrifugación (8) con algunas modificaciones. Se emplearon 5,0 g de tallos o raíces de clavel cortados en segmentos de 0,5-1,0 cm de longitud. Para la infiltración, el material vegetal se colocó dentro de tubos falcon (50 mL) y se adicionaron 20 mL de solución de infiltración. Posteriormente, empleando una bomba de vacío de paleta Gast G588DX, se realizaron 3 pulsos de vacío de 20 s con intervalos de 30 s, generando una presión de 70 kPa.

Los tallos o raíces fueron infiltrados con las siguientes soluciones de infiltración: 1. Tris-HCl 50 mM pH 8,0/NaCl 50 mM/ $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 % v/v; 2. Tris-HCl 50 mM pH 8,0/NaCl 0,6 M/ $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 % v/v; 3. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 6,5/NaCl 50 mM/ $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 % v/v; 4. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 6,5/NaCl 0,6 M/ $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 % v/v; 5. agua/ $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 % v/v y 6. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 6,5/NaCl 50 mM. La selección de la solución de infiltración se realizó teniendo en cuenta el rendimiento (mg proteína/g material vegetal base seca), contaminación con proteínas intracelulares y calidad en la separación en 1D SDS-PAGE.

Posteriormente, los fragmentos de material vegetal se filtraron al vacío durante 5 s y se transfirieron a un tubo falcon de 50 mL con un aditamento especial, un círculo de plástico con orificios, que permitió separar el fluido apoplástico de las raíces o los tallos empleados, por centrifugación a 1000 x g durante 20 min a 4 °C (23).

Para la obtención de una mayor cantidad de fluido apoplástico se realizaron ensayos empleando una segunda centrifugación sobre el mismo material vegetal. El fluido apoplástico fue colectado en la parte inferior del tubo y los extractos se guardaron a -20 °C.

### Verificación de contaminación intracelular

Para evaluar si los fluidos apoplásticos obtenidos presentaban contaminación con proteínas intracelulares, generada por un posible rompimiento de las membranas plasmáticas, se determinó la actividad de dos enzimas intracelulares. La malato deshidrogenasa (MDH), empleada para estimar el nivel de daño en la membrana celular, y la  $\alpha$ -manosidasa, como marcador de proteínas procedentes de vacuola (1).

La actividad MDH fue determinada por un método modificado a partir de lo reportado por Zhang *et al.* (24). La actividad enzimática fue medida de acuerdo a la disminución en la absorbancia a 340 nm durante 90 s; por adición de 10  $\mu$ L de fluido apoplástico a 300  $\mu$ L de la mezcla de reacción (oxaloacetato (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) 0,17 mM y NADH 0,094 mM disueltos en solución amortiguadora Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M pH 7,4.) a 20 °C, usando un espectrofotómetro (Genesys uv 10, ThermoFisher, USA). El mismo sistema de reacción, únicamente con adición de buffer fue empleado como blanco. La actividad se expresó en porcentaje relacionado con un extracto total, donde el material vegetal fue macerado con nitrógeno líquido para romper las membranas celulares.

La actividad  $\alpha$ -manosidasa fue determinada por un método modificado por Ramírez (23), a partir de lo reportado por Boller y Kende (25), en donde se emplean 100  $\mu$ L del sustrato p-nitrofenol- $\alpha$ -manopiranosido 5 mM disuelto en solución amortiguadora CH<sub>3</sub>COONa-CH<sub>3</sub>COOH 0,01 M pH 4,0 y 20  $\mu$ L de fluido apoplástico. Las muestras se incubaron durante 2 h a 37 °C. La reacción se detuvo con 1,1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 M y se midió la absorbancia a 420 nm empleando un espectrofotómetro (Genesys uv 10, ThermoFisher, USA). La actividad para estas dos enzimas, se expresó en porcentaje en relación con un extracto total, donde el material vegetal fue macerado con nitrógeno líquido para romper las membranas celulares.

### Efecto del $\beta$ -mercaptoetanol en la solución de infiltración

Para identificar el efecto de la adición de un agente reductor ( $\beta$ -mercaptoetanol) en la extracción del fluido apoplástico de raíces y tallos de clavel, se realizó un ensayo empleando las soluciones de infiltración 3 y 6. La selección de las condiciones se realizó teniendo en cuenta el rendimiento (mg proteína/g material vegetal base seca), contaminación con proteínas intracelulares y calidad en la separación en 1D SDS-PAGE.

## Precipitación de proteínas

Con el fin de eliminar interferentes que pueden llegar a afectar la separación y análisis electroforéticos posteriores, las proteínas contenidas en los diferentes extractos fueron precipitadas empleando dos métodos diferentes, uno basado en la precipitación con ácido tricloroacético (TCA)-acetona y el otro basado en la precipitación con TCA-acetona y subsecuente extracción con fenol (16).

Para el método TCA-acetona se partió de 1 mL de fluido apoplástico y se adicionó 1 mL de TCA al 10% *p/v* con ditioneitol (DTT) 0,07% *p/v* en acetona. Los tubos se agitaron y se mantuvieron a 4 °C durante toda la noche. Luego de centrifugar a 16000 x g durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante se descartó y al pellet se le hicieron 4 lavados, 3 de ellos con 1 mL de acetona pura y finalmente 1 con acetona al 80% (*v/v*), centrifugando a 16000 x g durante 5 minutos a 4 °C, después de cada paso de lavado. El pellet resultante se secó a temperatura ambiente para eliminar los residuos de acetona.

Para el método TCA-acetona con posterior extracción con fenol, se partió de 1 mL de fluido apoplástico y se adicionó 1 mL de TCA al 100% *p/v* en acetona. Los tubos se agitaron y se mantuvieron a 4 °C durante toda la noche. Luego de centrifugar a 16000 x g durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 1 mL de una mezcla (1:1) de fenol saturado y solución amortiguadora de lisis (sacarosa 30% *p/v*, SDS 2% *p/v* y  $\beta$ -mercaptoetanol 5% *v/v*). Después de homogenizar vigorosamente con la punta de la micropipeta e incubar por 5 min en hielo, se centrifugó a 16000 x g durante 5 min a 4 °C. La fase fenólica (superior) se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionó 1 mL de acetato de amonio 0,1 M en metanol. Luego de dejar precipitar toda la noche a -20 °C, se centrifugó a 16000 x g durante 5 min a 4 °C para eliminar finalmente el sobrenadante por decantación. El pellet resultante se lavó con 1 mL de metanol al 100% y posteriormente con 1 mL de acetona al 80%, realizando centrifugaciones en cada caso a 16000 x g durante 5 min a 4 °C. Finalmente, el pellet se secó a temperatura ambiente para eliminar los residuos de acetona.

Para la separación de las proteínas por electroforesis los pellets obtenidos por ambos métodos (TCA-acetona o TCA-acetona/fenol) fueron resuspendidos en 100  $\mu$ L o 50  $\mu$ L de solución de solubilización (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (*p/v*), Tritón X-100 0,5% (*p/v*) y DTT 100 mM), de acuerdo a si la muestra de fluido apoplástico provenía de tallo o raíz, respectivamente; las muestras se agitaron por 4 horas a 4 °C. La selección del protocolo de extracción de proteínas se realizó teniendo en cuenta la cantidad de proteína obtenida ( $\mu$ g proteína/g material vegetal peso fresco) y la calidad de la separación en 1D SDS-PAGE.

La cuantificación de proteínas provenientes de fluido apoplástico de clavel se realizó empleando el método de Bradford (26), de acuerdo a la modificación de Ramagli (27), empleando el reactivo de Bio-Rad®. Para ello se tomaron 1  $\mu$ L de muestra, 250  $\mu$ L del reactivo de Bradford y 749  $\mu$ L de agua ultrapura. Las muestras se procesaron con réplica técnica, midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Genesys uv 10, ThermoFisher, USA). Se utilizó Albúmina Sérica Bovina (BSA) como estándar de proteína.

## Electroforesis SDS-PAGE

Dentro de las condiciones evaluadas para la separación de proteínas presentes en el fluido apoplástico de raíces y tallos de clavel se tuvieron en cuenta el tiempo de calentamiento de las muestras (5 y 10 min) y la cantidad de proteína empleada (5, 10, 15 y 20  $\mu$ g), esto con el fin de definir las condiciones fundamentales para obtener la mejor calidad de los geles de electroforesis en 1D.

Se emplearon geles discontinuos de poliacrilamida en formato de 7 cm, empleando 5% para el gel de concentración y 12% para el gel de resolución, bajo condiciones reductoras con  $\beta$ -mercaptoetanol. La electroforesis se corrió a corriente constante (13 mA en el gel de concentración y 18 mA en el gel de resolución) según protocolo de Bio-Rad® en el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, California, USA), usando como buffer de corrido Tris base 25 mM, glicina 0,20 M y SDS 0,10% *p/v*. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie coloidal G-250 (ver Visualización de proteínas).

El análisis de la metodología seleccionada en muestras de fluido apoplástico proveniente de claveles control e inoculados fue realizada empleando el sistema Stain-Free Criterion de Bio-Rad®, USA, con geles preteñidos y prefabricados con un gradiente continuo del 4 al 20% y como marcador de peso molecular Precisión Plus Protein Standards Bio-Rad®, USA. Esto se realizó con el fin de determinar con la mayor sensibilidad posible los cambios en los perfiles electroforéticos por efecto de la infección con el patógeno. Se emplearon 20  $\mu$ g de proteína por muestra, procedente de fluido apoplástico de tallo y raíz, y la separación se realizó a voltaje constante (150 V), empleando como buffer de corrido Tris-Base 25 mM, glicina 0,20 M y SDS 0,10% *p/v*.

## Visualización de proteínas

Para los geles de poliacrilamida al 12%, se realizó tinción con azul de Coomassie coloidal G-250 (20). El protocolo consistió en la incubación de los geles con la solución de tinción (metanol 20% *v/v*, sulfato de amonio 0,8% *p/v*, ácido fosfórico 2,25% *v/v* y Coomassie coloidal G-250 0,1% *p/v*) durante 72 h. El exceso del agente de tinción se eliminó mediante lavados con agua ultrapura durante 5 min, solución de metanol al 25% *v/v* durante 5 min y solución de sulfato de amonio al 20% *p/v* para mantenerlos. Los geles del sistema Stain-Free Criterion de Bio-Rad®, USA, fueron visualizados usando el equipo Criterion Stain Free™ - Gel Imaging System de Bio-Rad®, USA.

La calidad de la separación se evaluó en cada órgano de la planta determinando tanto el número de bandas obtenido para cada uno de los tratamientos ensayados, como la resolución en la separación de las mismas. Para los diferentes ensayos se usó el programa Image Lab de Bio-Rad®, USA.

## Electroforesis 2D

### Primera dimensión-enfoque isoeléctrico (IEF)

Para la separación en la primera dimensión se usaron tiras IPG (Inmovilized pH Gradient) de 11 cm, en el rango de pH 3-10 y pH 5-8 Bio-Rad®, USA. Se usaron 100  $\mu$ g o 200  $\mu$ g de proteína de cada órgano y se mezclaron con solución de hidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% *p/v*, azul de bromofenol 0,1% *p/v*, DTT 100 mM y anfolitos 0,2% *v/v* en el rango de pH 3-10 o 5-8 según las tiras empleadas), hasta completar 185  $\mu$ L.

El isoelectroenfoque se corrió en el equipo Protean IEF cell (Bio-Rad®, California, USA), aplicando las siguientes condiciones: 16 h de rehidratación activa a 50 V; 250 V, 15 min; 8000 V, 1 h 30 min; 8000 V/h hasta acumular 30000 V y 500 V 1 h. Se empleó una temperatura de 20 °C y una corriente de 50 µA por tira. Una vez finalizado el programa, las tiras IPG se almacenaron a -20 °C (16).

### Segunda dimensión-SDS-PAGE

Antes de realizar la electroforesis SDS-PAGE, las tiras se sometieron a un proceso de equilibrio, como indica Ardila *et al.* (16). Para la segunda dimensión se usaron geles prefabricados del sistema Criterion de Bio-Rad®, USA, con un gradiente de 4 a 20%, empleando el patrón de peso molecular antes mencionado. La tira y el marcador de peso molecular se colocaron sobre la superficie del gel; posteriormente este se selló con agarosa al 1% *p/v* mezclada con azul de bromofenol 0,001 % *p/v*. La segunda dimensión se corrió a 150 V constantes, en una cámara del sistema Criterion de Bio-Rad®, USA.

### Análisis de imágenes 2 DE

Las imágenes de los geles 2DE se adquirieron empleando el equipo Stain-Free Criterion™ Gel Imaging System de Bio-Rad®, USA. El análisis de la imagen se realizó con el programa PDQuest 7.2 Bio-Rad®, utilizando parámetros para la detección de *spots*. Además, se evaluó de manera visual la presencia de *striking* en los diferentes geles obtenidos para extractos de tallos y raíces de clavel, para determinar la existencia de contaminantes no proteicos y la separación de las proteínas teniendo en cuenta la cantidad aplicada y el rango de pH empleado en las tiras del isoelectroenfoque.

### Análisis estadístico

Para el rendimiento en la obtención de proteínas con las diferentes soluciones de infiltración se realizó un análisis estadístico, igualmente para el análisis de las actividades enzimáticas empleadas como marcadores de contaminación intracelular y para la selección del método de precipitación de proteínas, evaluados a través triplicados biológicos. Los datos fueron reportados como medias  $\pm$  SD. El análisis de varianza y las diferencias significativas entre las medias se analizaron mediante ANOVA de una vía utilizando Statgraphics® Software versión 5.1. ( $p < 0,05$ ).

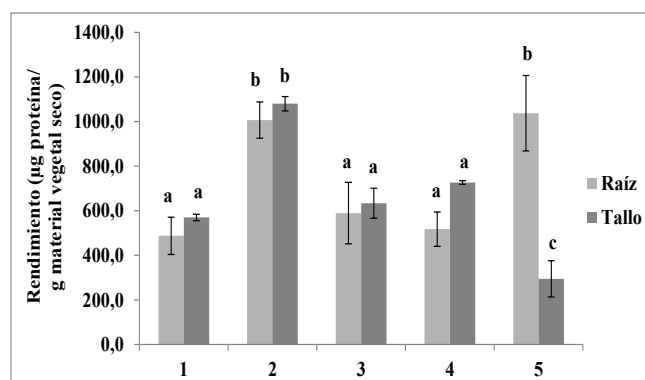
## Resultados y discusión

### Obtención de fluido apoplástico de clavel

#### Selección de la solución de infiltración

De las cinco soluciones de infiltración evaluadas, se encontró que el mayor rendimiento de extracción para proteínas apoplásticas de raíces y tallos de clavel se obtuvo con la solución amortiguadora número 2 (Figura 1).

Sin embargo, la selección de la solución de infiltración debe considerar la actividad enzimática  $\alpha$ -manosidasa y malato deshidrogenasa (MDH), indicadores de la contaminación con proteínas intracelulares (1, 24, 25). Al respecto, se encontró que para el caso de la actividad MDH en los fluidos apoplásticos obtenidos, el  $\beta$ -mercaptoetanol puede actuar como interferente, debido a su carácter reductor (Tabla 1).



**Figura 1.** Rendimiento en la obtención de proteínas presentes en fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel variedad Gran Slam, empleando las soluciones de infiltración 1-5. Las barras verticales representan la desviación standard de cada promedio ( $n = 3$ ). Los valores para cada variedad y cada determinación que presentan diferente letra, presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

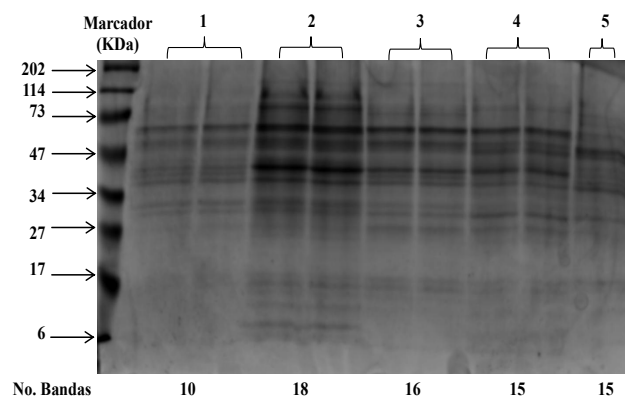
**Tabla 1.** Determinación de las enzimas MDH y  $\alpha$ -manosidasa en fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel, empleando cinco diferentes soluciones de infiltración

Solución	Material vegetal	MDH (%)	$\alpha$ -manosidasa (%)	Material vegetal	MDH (%)	$\alpha$ -manosidasa (%)
1	Raíz	N.D	3,79 <sup>b</sup>	Tallo	N.D	5,19 <sup>b</sup>
2	Raíz	N.D	24,5 <sup>a</sup>	Tallo	N.D	8,66 <sup>a</sup>
3	Raíz	N.D	0,273 <sup>d</sup>	Tallo	N.D	0,0125 <sup>e</sup>
4	Raíz	N.D	0,619 <sup>c</sup>	Tallo	N.D	0,498 <sup>d</sup>
5	Raíz	N.D	3,67 <sup>b</sup>	Tallo	N.D	1,23 <sup>c</sup>

Los resultados se presentan como el promedio de tres determinaciones. N.D: No detectado

Por el contrario, para el caso de la actividad  $\alpha$ -manosidasa, no se observa efecto en el método de determinación cuando dicho agente está presente en las soluciones de infiltración evaluadas (Tabla 1). Los resultados encontrados muestran que los valores más bajos de contaminación intracelular, al nivel de significancia trabajado ( $p < 0,05$ ), se obtienen al emplear la solución amortiguadora número 3. Se presentaron valores menores al 0,3% respecto a la actividad encontrada para el extracto crudo, lo cual está dentro de los valores reportados en otras investigaciones, como es el caso del fluido apoplástico proveniente de papa (*Solanum tuberosum* L. variedad Spunta y variedad Innovator) en su interacción con el patógeno *Phytophthora infestans* (5).

En cuanto a la evaluación de los perfiles de separación de las proteínas por SDS-PAGE, se evidencia que el mayor número de bandas se obtiene con la solución amortiguadora número 2 (Figura 2, carril 2). Sin embargo, es probable que este mayor número de bandas se deba a la presencia de proteínas intracelulares, en concordancia con los resultados previamente descritos que sugieren contaminación intracelular al usar dicha solución de infiltración (Tabla 1).



**Figura 2.** 1D SDS-PAGE para la comparación de las diferentes soluciones de infiltración empleadas en la extracción de fluido apoplástico de tallos de clavel variedad Gran Slam. 20 µg proteína, empleando un gel de separación al 12% y un gel de concentración al 5%

Estos resultados contrastan con lo encontrado con la solución de infiltración número 3 (Figura 2, carril 3), en donde además de presentar baja contaminación intracelular (actividad  $\alpha$ -manosidasa del 0,3% comparada con el 24,5% obtenida para la solución número 2), el número de bandas es superior al encontrado con las demás soluciones de infiltración evaluadas. Lo anterior indica que dicha solución es una buena candidata para ser usada en la obtención de proteínas a partir del apoplasto de tallos de clavel. Resultados similares se encontraron para fluido apoplástico procedente de raíces de clavel (datos no mostrados).

Resultados reportados en la literatura para la extracción de fluido apoplástico de hojas maíz muestran que al emplear  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM como solución amortiguadora, se presenta poco daño en la membrana plasmática y buena extracción de proteínas adheridas a la pared celular (15).

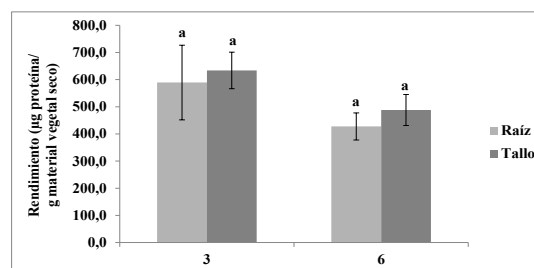
La presencia de bandas de proteínas con un peso molecular menor a 15 kDa es significativa en los extractos obtenidos con la solución de Tris-HCl de mayor fuerza iónica (Figura 2, carril 2). Esto no es común en el apoplasto, donde estas proteínas normalmente se encuentran en niveles bajos (15). Es probable que la baja polaridad del tris conlleve a una disrupción de las membranas plasmáticas de las células que constituyen el tejido y generen una mayor contaminación con proteínas intracelulares de este tamaño.

En conjunto, estos resultados indican que para la obtención de fluido apoplástico de tejido vegetal de clavel, se debe emplear la solución de infiltración número 3 con pH 6,5, baja fuerza iónica y presencia de agente reductor. Estos resultados sin duda, deben estar asociados a la similitud en términos de pH y fuerza iónica que existe entre esta solución de infiltración y las condiciones encontradas en tejidos vegetales.

Considerando que la centrifugación es un paso determinante para la obtención de un extracto libre de contaminantes intracelulares y en la cantidad de fluido apoplástico obtenido, se decidió evaluar la posibilidad de realizar centrifugaciones adicionales para aumentar la cantidad final de fluido apoplástico. Se determinó que una segunda centrifugación permite aislar más fluido apoplástico sin contaminación intracelular, según la determinación del marcador  $\alpha$ -manosidasa (Resultados no mostrados). Esto sugiere que la centrifugación adicional a 1000 x g puede ser empleada para obtener una mayor cantidad de extracto sin contaminación por ruptura celular, resultados que no han sido reportados previamente, en otras especies vegetales.

### Uso de agentes reductores

Considerando que el uso de agentes reductores como el  $\beta$ -mercaptoetanol puede aumentar la estabilidad y la solubilidad de las proteínas, pero que, a su vez, puede interferir en uno de los marcadores de contaminación intracelular (como la actividad enzimática de la MDH), se decidió evaluar si realmente era necesario su uso en la solución de infiltración previamente seleccionada. Para ello, se realizaron ensayos usando la solución amortiguadora de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M pH 6,5/ $\text{NaCl}$  50mM con y sin  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1% v/v y se compararon parámetros como el rendimiento, la contaminación intracelular y los perfiles de separación por electroforesis en 1D. De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 3), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos evaluados en términos del rendimiento de extracción ( $p < 0,05$ ). Así mismo, la comparación de la actividad  $\alpha$ -manosidasa tampoco muestra diferencias entre los mismos (Tabla 2), lo que indica que el uso de este agente reductor no afecta la estabilidad de la membrana plasmática durante el proceso de infiltración.



**Figura 3.** Rendimiento de la obtención de proteínas presentes en fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel, variedad Gran Slam, empleando solución de infiltración con y sin adición de un agente reductor. Las barras verticales representan la desviación standard de cada promedio (n = 3). Los valores para cada variedad y cada determinación que presentan diferente letra, presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

**Tabla 2.** Determinación de las enzimas MDH y  $\alpha$ -manosidasa en fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel, empleando solución de infiltración con y sin adición de un agente reductor

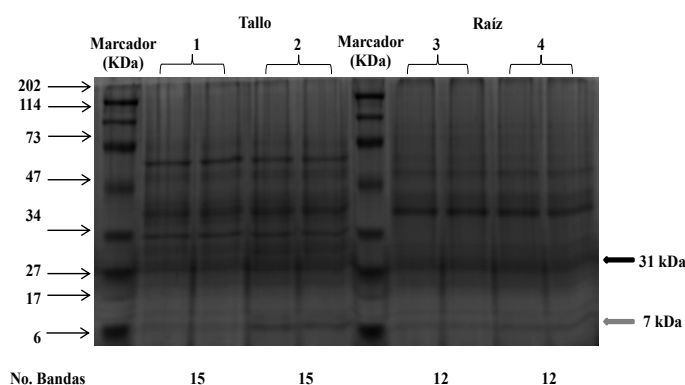
Solución	Material vegetal	MDH %	$\alpha$ -manosidasa (%)	Material vegetal	MDH %	$\alpha$ -manosidasa (%)
3	Raíz	N.D	0,273 <sup>a</sup>	Tallo	N.D	0,0125 <sup>a</sup>
6	Raíz	1,16	0,258 <sup>a</sup>	Tallo	1,21	0,0433 <sup>a</sup>

Los resultados se presentan como el promedio de tres determinaciones. N.D.: No detectado

El efecto que presentan el pH, la fuerza iónica y las características químicas de los componentes de la solución de extracción previamente seleccionada ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M pH 6,5/ $\text{NaCl}$  50 mM) sobre la estabilidad de la membrana, se puede comprobar con la determinación de la actividad MDH en fluido apoplástico obtenido con esta solución sin agente reductor. Considerando que su actividad es apenas el 1% con respecto al valor obtenido para extracto crudo, se evidencia que no existe contaminación citoplasmática al usar dicha solución (Tabla 2). Estos resultados son similares a los encontrados en otros estudios (28) en donde se ha observado que la actividad enzimática MDH de los fluidos de apoplasto es apenas del 1 al 3% del valor obtenido para un extracto crudo de la misma especie vegetal (29). En general, estos resultados son considerados bajos si se tiene en cuenta que hay reportes donde se han tolerado valores en el rango del 3 al 10% (30).

La localización citoplásmica de la MDH permite que la determinación de su actividad sea comúnmente usada como marcador de la calidad del fluido apoplástico obtenido; la baja o ausencia de actividad para esta enzima indica una pobre o ausente contaminación con proteínas citoplasmáticas (1, 3). Así mismo, los resultados obtenidos para la solución amortiguadora  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M pH 6,5/ $\text{NaCl}$  50 mM, con y sin agente reductor, no muestran diferencias significativas en cuanto a rendimiento y contaminación intracelular (Tabla 2 y Figura 3).

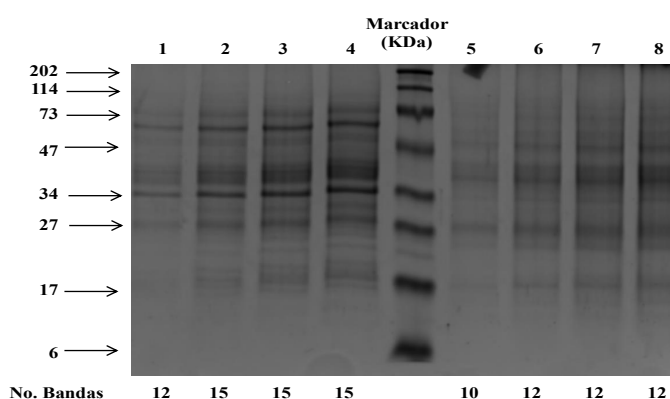
Sin embargo, al realizar la electroforesis 1D SDS-PAGE, se determinó que existe mayor intensidad en las bandas de proteínas con peso molecular de aprox. 31 KDa y 7 KDa, cuando se emplea  $\beta$ -mercaptoetanol dentro de la solución de infiltración (Figura 4, carril 2). Esto indica que es necesario el uso de éste dentro de la solución de infiltración a emplearse en esta parte del proceso. Estos resultados son predecibles, considerando que la presencia de este agente reductor en la solución de infiltración evita la posible formación de puentes disulfuro entre proteínas que presenten grupos sulfhidrilo libres, que en este caso tienen pesos moleculares de 31 y 7 kDa. La posible formación de estructuras oligoméricas bajo condiciones no reductoras es un fenómeno previamente descrito para varias proteínas en otros modelos (31, 32).



**Figura 4.** 1D SDS-PAGE para la comparación del efecto de un agente reductor presente en la solución de infiltración empleada en la obtención de fluido apoplástico de tallo y raíz de clavel, variedad Golem. Se emplearon 10 µg proteína, gel de separación al 12% y gel de concentración al 5%. Al lado derecho del gel se encuentran señaladas las bandas de interés (6,7 kDa para tallo y 30, 6 kDa en tallo y raíz)

### Electroforesis SDS-PAGE

Se deben tener en cuenta también algunos parámetros experimentales para la obtención de una buena resolución en los geles de proteínas en SDS-PAGE, por ejemplo, el tiempo de calentamiento de la muestra y la cantidad de proteína sembrada en cada pozo del gel. En el formato empleado en la presente investigación (7 cm), se encontró que un tiempo de calentamiento de 10 min permite aumentar la nitidez de las bandas, debido a que probablemente en este tiempo se presenta una mayor interacción entre los agentes denaturantes presentes en el buffer carga y las proteínas del extracto (Resultados no mostrados). En cuanto a la cantidad de proteína empleada, se encontró que a partir de 10 µg (Figura 5, carril 2 y 6) se presenta una buena sensibilidad para la detección de las bandas, lo cual representa una gran ventaja dado que la cantidad de proteína obtenida a partir de fluido apoplástico es baja, alrededor de 100 µg proteína/g material vegetal peso fresco (Tabla 3).



**Figura 5.** 1D SDS-PAGE para la comparación de diferentes cantidades de proteínas presentes en extractos de proteínas provenientes del fluido apoplástico de tallo y raíz de clavel, variedad Golem, empleando la solución de infiltración número 3 y diferentes cantidades de proteína. Gel de separación al 12% y gel de concentración al 5%. Tallo, 5 µg (carril 1), 10 µg (carril 2), 15 µg (carril 3), 20 µg (carril 4), Raíz 5 µg (carril 5), 10 µg (carril 6), 15 µg (carril 7), 20 µg (carril 8)

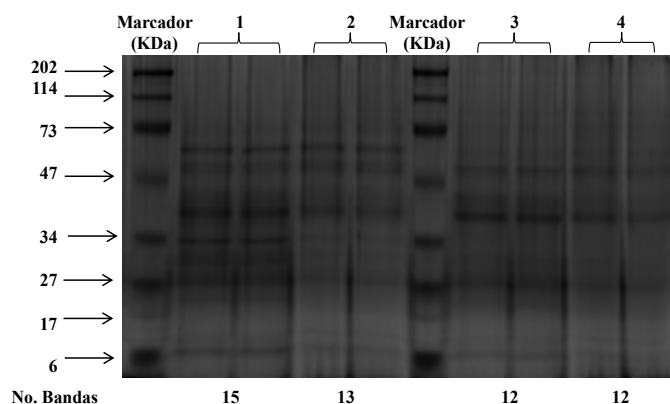
**Tabla 3.** Rendimiento para los diferentes métodos de extracción de proteínas presentes en fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel. TCA/acetona (A) y TCA/acetona/fenol (B)

Rendimiento (µg proteína/g material vegetal peso fresco)	Procedimiento A.	%Recuperación	Procedimiento B.	%Recuperación
Tallo	119,4 ± 14,7 <sup>a</sup>	100,0	72,7 ± 1,3 <sup>b</sup>	60,4
Raíz	142,0 ± 20,4 <sup>a</sup>	100,0	62,5 ± 8,4 <sup>b</sup>	44,0

Los resultados se presentan como el promedio de tres determinaciones ± la desviación estándar

### Precipitación y concentración de proteínas para electroforesis

En este caso, se emplearon dos métodos reportados para precipitación de proteínas de tallos y raíces de clavel (16). El método A se basa en el uso de TCA/acetona y el método B, se basa en el uso de TCA/acetona/fenol. La selección se realizó teniendo en cuenta el rendimiento en la cantidad de proteína finalmente solubilizada determinada por Bradford (Tabla 3) y la separación en 1D SDS-PAGE (Figura 6).



**Figura 6.** Geles de extractos de proteínas obtenidas usando 1 método ATC/acetona en tallo, 2 método ATC/acetona/fenol en tallo, 3 método ATC/acetona en raíz, 4 método ATC/acetona/fenol en raíz. Se emplearon 10 µg de proteína en cada carril y un gel de poliácridamida-SDS al 12%. El gel fue teñido con Coomassie coloidal. Las muestras empleadas provienen de fluido apoplástico de tallo y raíz de clavel variedad Golem, empleando la solución de infiltración número 3

Los resultados obtenidos muestran que al emplear el método B, se presenta una menor recuperación de proteína a la obtenida con el método A presentando un 60,4% y 44,0% de lo obtenido con el método A, para tallo y raíz respectivamente (Tabla 3). Por otro lado, al evaluar el número de bandas durante la separación de las proteínas presentes en los diferentes extractos mediante electroforesis en 1D SDS-PAGE (Figura 6) se encontró que, si bien es cierto que los dos métodos empleados no presentan contaminantes que afecten la calidad de la separación y la resolución de las bandas, sí se presentan diferencias en el número de bandas que corroboran los resultados obtenidos en rendimiento.

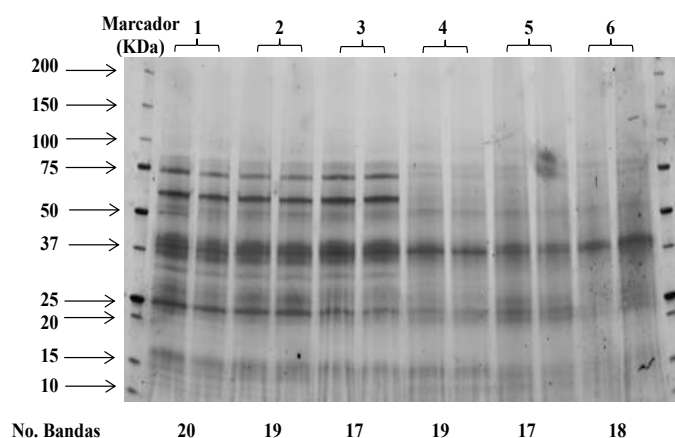
Se encontró a través del método B un menor número de bandas (Figura 6, carriles 2 y 4), debido probablemente a la pérdida de proteínas durante el procedimiento experimental descrito. Esto indica que para la precipitación de proteínas presentes en el fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel, se debe emplear el método A que incluye únicamente el tratamiento con TCA y acetona, tal y como ha sido reportado en estudios con otras especies vegetales (19, 33, 34). En general, estos resultados contrastan con lo encontrado en estudios previos realizados con el grupo de investigación, donde el método que incluye fenol presenta los mejores resultados en términos de número de bandas y presencia de contaminantes no proteicos para extractos totales de tallos y raíces (16). Lo anterior debido a que el fenol es uno de los agentes disociadores más fuertes que disminuye las interacciones entre las proteínas y diversos contaminantes (35-37).

Los resultados encontrados en clavel muestran claramente cómo el método de precipitación y concentración de proteínas depende de la complejidad de la muestra a trabajar ya que, cuando se parte de material vegetal total, es necesario emplear el método TCA/acetona/fenol para eliminar interferentes en análisis electroforéticos como carbohidratos, ácidos nucleicos, fenoles, lípidos y sales (20). Por el contrario, para el caso del fluido apoplástico, debido a que es una muestra que presenta un menor número de moléculas interferentes, el método TCA/acetona es suficiente para generar una muestra que pueda ser empleada en análisis electroforéticos, contando además con un buen rendimiento en la obtención de proteínas, necesario en este tipo de estudios donde la cantidad de fluido apoplástico obtenido a partir de material vegetal es tan bajo.

#### Electroforesis SDS-PAGE de muestras inoculadas con *Fod*

Con el fin de verificar que las condiciones seleccionadas fueran adecuadas para el análisis de proteínas del fluido apoplástico de raíces y tallos de clavel, durante la inoculación con el patógeno *Fod*, se realizó un análisis diferencial cualitativo de las bandas de proteínas presentes en el apoplasto de dichos tejidos, comparando con el correspondiente control. De esta manera, bajo las condiciones previamente descritas se realizaron extracciones de apoplasto a partir de material vegetal sin inocular con el patógeno (día 0 y día 7, control) e inoculado con el mismo (día 7) (Figura 7). Los resultados muestran que las condiciones seleccionadas pueden ser usadas de manera exitosa, tanto para tejidos control, como para aquellos que han sido inoculados con el patógeno.

Al comparar los diferentes tratamientos se evidencia que no existen diferencias cualitativas entre las proteínas presentes en el apoplasto de las muestras control y las muestras inoculadas, al menos bajo las condiciones de detección empleadas.



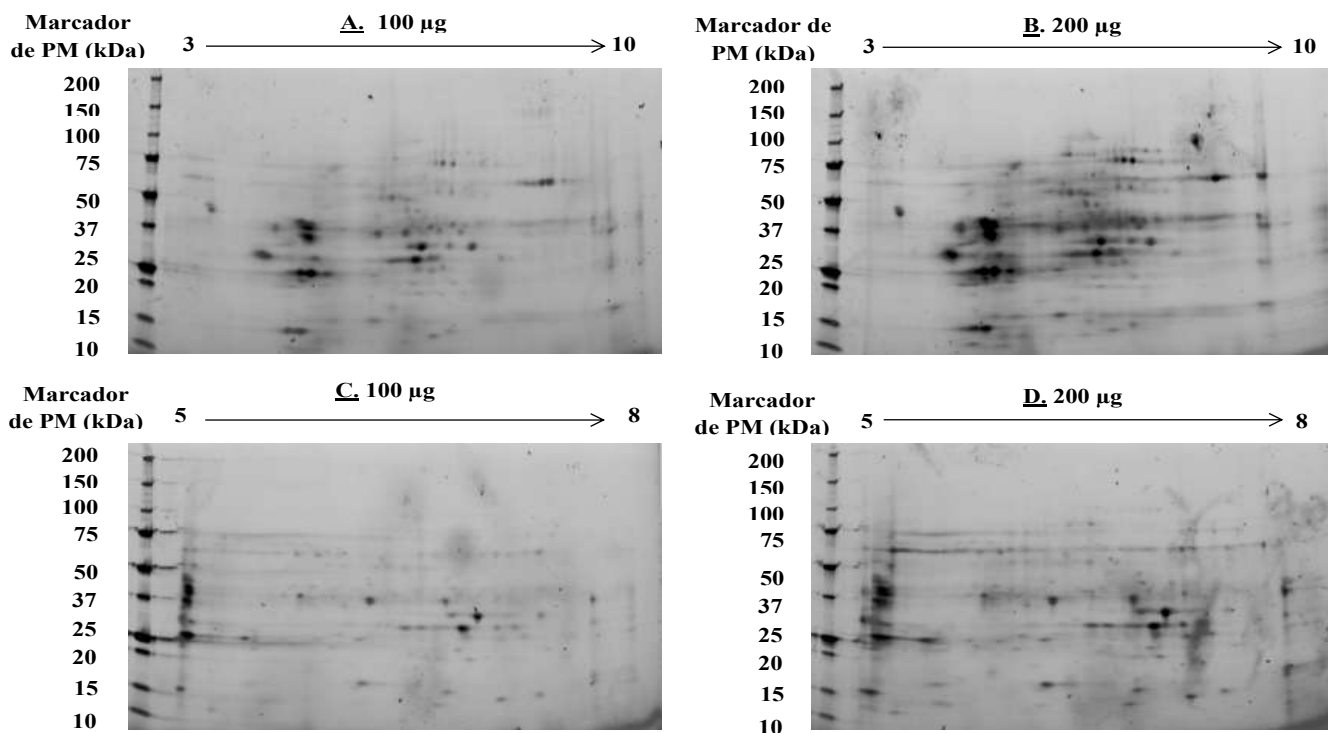
**Figura 7.** 1D SDS-PAGE para la comparación de extractos de proteínas en diferentes tiempos y con inoculación con FOD provenientes del fluido apoplástico de tallo y raíz de clavel, empleando la solución de infiltración número 3. 20 µg de proteína. Gel Criterion Stain Free™ Bio Rad, USA. Gradiente 4-20%. 1 Tallo día 0 control, 2 Tallo día 7 control, 3 Tallo día 7 inoculado, 4 Raíz día 0 control, 5 Raíz día 7 control, 6 Raíz día 7 inoculado

Estos resultados son similares a los encontrados en trabajos previos realizados en el grupo de investigación, donde no se presentan diferencias cualitativas apreciables en el número de bandas en extractos totales de proteínas, entre controles e inoculados con el patógeno usando electroforesis en 1D (16). Los resultados obtenidos en esta parte de la investigación muestran además que la metodología puede ser empleada de manera confiable para análisis de proteínas provenientes de fluido apoplástico, de tallos y raíces control e inoculados con el patógeno.

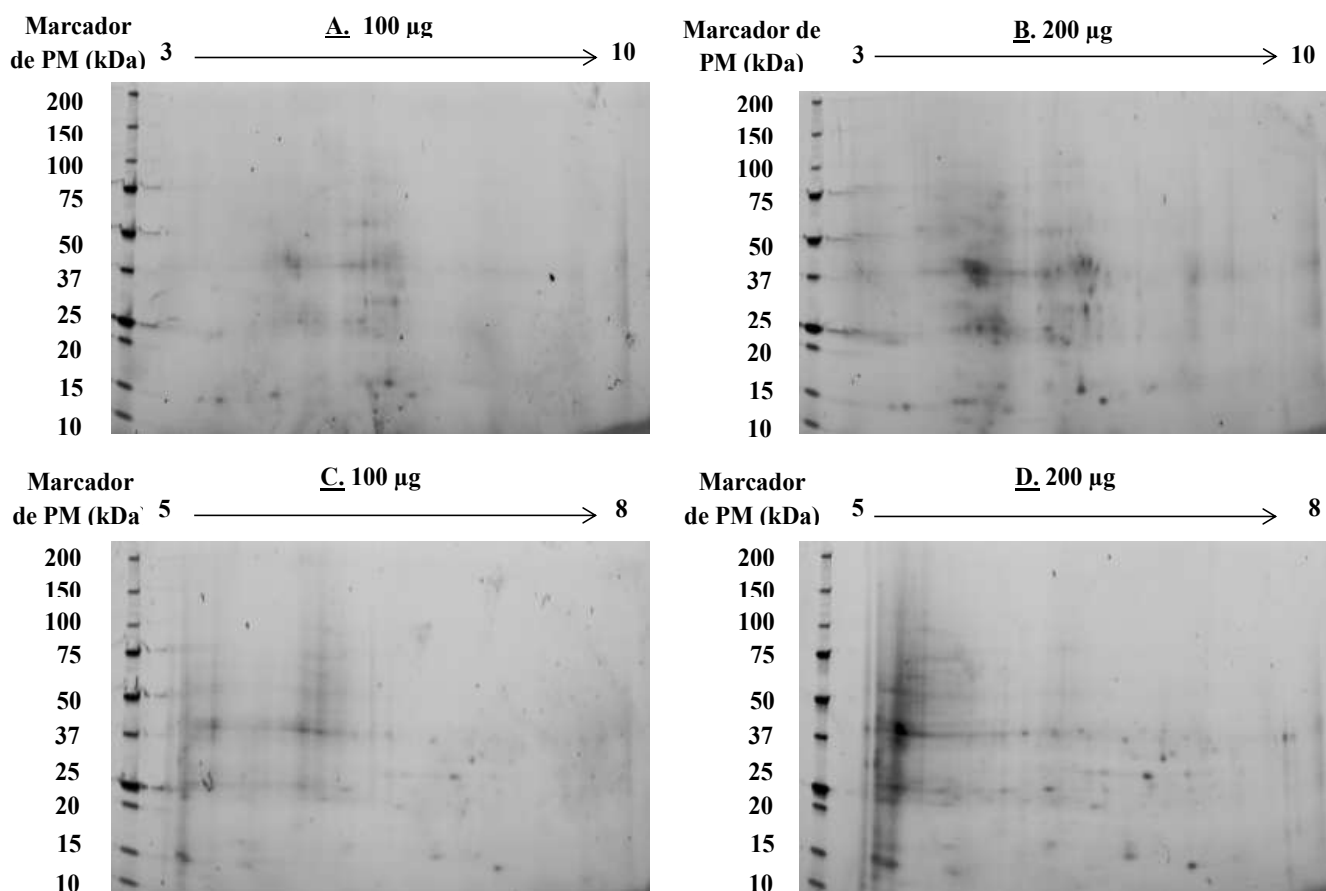
#### Análisis de apoplasto de raíces y tallos de clavel por 2DE (IEF-SDS-PAGE)

La Figura 8 muestra los resultados obtenidos para proteínas apoplásticas de tallo, donde se encuentra un mayor número de manchas y una mayor resolución durante la separación, al emplear tiras de IPG en el rango de pH 3-10 (Tabla 4). Los resultados obtenidos en este órgano son similares a los obtenidos en estudios proteómicos del apoplasto de hojas de colza (*Brassica napus*) en su interacción con *Verticillium longisporum*, donde se encuentran 170 spots, empleando 80 µg de proteína y tiras de IPG pH 3-10 (3).

Para el caso de la raíz (Figura 9), empleando 200 µg de proteína y tiras de IPG pH 5-8, la resolución en las manchas de proteína es superior. De hecho, si se comparan los dos rangos de pH a esta misma concentración de proteína, no existen diferencias importantes entre el número de manchas resueltas, pero sí en la resolución de la separación, siendo mayor en el primero. Por lo anterior, para este órgano de la planta, el análisis de proteínas apoplásticas se debe realizar usando tiras de IPG en rango pH 5-8 para la primera separación por isoelectroenfoque. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios, en donde se han encontrado los mismos rangos de pH para la separación en la primera dimensión (18, 34).



**Figura 8.** Electroforesis en 2D para los extractos obtenidos mediante el procedimiento TCA/Acetona a partir de fluido apoplástico de tallos de clavel, con diferentes cantidades de proteína total y rango de pH en cada tira de isoelectroenfoque. **A.** 100 µg, pH 3-10, **B.** 200 µg, pH 3-10, **C.** 100 µg, pH 5-8, **D.** 200 µg, pH 5-8



**Figura 9.** Electroforesis en 2D para los extractos obtenidos mediante el procedimiento TCA/Acetona a partir de fluido apoplástico de raíces de clavel, con diferentes cantidades de proteína total y rango de pH en cada tira de isoelectroenfoque. **A.** 100 µg, pH 3-10, **B.** 200 µg, pH 3-10, **C.** 100 µg, pH 5-8, **D.** 200 µg, pH 5-8

**Tabla 4.** Condiciones de análisis para la separación en 2D de proteínas de fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel variedad Golem

Tejido	Cantidad de proteína (μg)	Tiras IPG	No. spots*	Resolución**
Tallo	100	pI 3-10	119	Buena
		pI 5-8	117	Buena
	200	pI 3-10	193	Muy buena
		pI 5-8	182	Buena
Raíz	100	pI 3-10	57	Buena
		pI 5-8	86	Buena
	200	pI 3-10	107	Buena
		pI 5-8	98	Muy buena

\*Los valores encontrados de número de manchas son obtenidos mediante el programa PDQuest.

\*\*La resolución se determinó mediante inspección visual y evaluando el enfoque de una misma mancha proteica en los diferentes tratamientos evaluados.

Un análisis comparativo preliminar permite observar que algunas de las manchas proteicas se comparten en geles obtenidos a partir de fluido apoplástico de raíces y tallos de la planta, indicando que muchos de ellos deben contener proteínas que participan en procesos conservados en las células vegetales a nivel extracelular. Así mismo, se evidencian también manchas proteicas que son particulares de cada órgano, las cuales probablemente deben estar asociadas a otros procesos que se llevan a cabo de manera tejido-dependiente. Diferencias en la distribución de proteínas en función del órgano de la planta objeto de estudio han sido reportados en diferentes especies vegetales (38, 39).

## Conclusiones

Para la obtención de fluido apoplástico presente en tallos o raíces de clavel, se debe emplear la solución amortiguadora  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M pH 6,5/ $\text{NaCl}$  50 mM/ $\beta$ -mercaptoetanol 0,1% v/v como solución de infiltración, ya que presenta buen rendimiento en la obtención de proteínas y la menor contaminación con proteínas intracelulares. Además, se pueden realizar dos centrifugaciones sobre el mismo material vegetal para obtener una mayor cantidad de fluido apoplástico, sin generar rompimiento de la membrana citoplasmática. En cuanto a la precipitación de proteínas, el método TCA/acetona presenta un rendimiento superior al 80% comparado con el método TCA/acetona/fenol, eliminando interferentes de tipo no proteico, presentes en la muestra. Para los análisis proteómicos en 2D (IEF-SDS-PAGE), se deben emplear 200 μg de proteína y tiras de IPG con pH 3-10 cuando las muestras proceden de fluido apoplástico de tallo, y 200 μg de proteína y tiras de IPG con pH 5-8 cuando proceden de fluido apoplástico de raíz. Este procedimiento puede ser aplicado a otras especies vegetales, con el fin de estudiar la dinámica del proteoma apoplástico en procesos biológicos que pueden incluir la interacción con patógenos.

## Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá (Proyecto DIB No. 201010023394), a Colciencias por la financiación del proyecto No. 110165842786 y al programa de apoyo a estudiantes de doctorado convocatoria 617. Especial agradecimiento a Florval S.A.S-Sede QFC por la donación del material vegetal empleado en estos estudios.

## Referencias

1. Delaunoy, B.; Jeandet, P.; Clément, C.; Baillieu, F.; Dorey S.; Cordelier, S. Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 249. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00249>.
2. Ge, Y.; Bi, Y.; Guest, D.I. Defense responses in leaves of resistant and susceptible melon (*Cucumis melo* L.) cultivars infected with *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2013**, *81*, 13–21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.09.002>.
3. Floerl, S.; Druebert, C.; Majcherczyk, A.; Karlovsky, P.; Kues, U.; Polle, A. Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. *BMC Plant Biol.* **2008**, *8*, 129. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-129>.
4. Floerl, S.; Majcherczyk, A.; Possienke, M.; Feussner, K.; Tappe, H.; Gatz, C.; et al. *Verticillium longisporum* Infection Affects the Leaf Apoplastic Proteome, Metabolome, and Cell Wall Properties in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. **2012**, *7*, (2), e31435. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031435>.
5. Fernández, M. B.; Pagano, M.R.; Daleo, G.R.; Guevara, M.G. Hydrophobic proteins secreted into the apoplast may contribute to resistance against *Phytophthora infestans* in potato. *Plant Physiol. Biochem.* **2012**, *60*, 59–66. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.017>.
6. Goulet, C.; Goulet, M.C.; Michaud, D. 2-DE proteome maps for the leaf apoplast of *Nicotiana benthamiana*. *Proteomics*. **2010**, *10*, 2536–2544. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.200900382>.
7. 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*, 232–238. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.10402118>.
8. Lohaus, G.; Pennewiss, K.; Sattelmacher, B.; Hussmann, M.; Hermann Muehling, K. Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiol. Plant.* **2001**, *111*, 457–465.
9. Agrawal, G.K.; Jwa, N.S.; Lebrun, M.H.; Job, D.; Rakwal R. Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*. **2010**, *10*, 799–827. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.200900514>.
10. Wimmer, M.A.; Mühling, K.H.; Läuchli, A.; Brown, P.H.; Goldbach, H.E. The interaction between salinity and boron toxicity affects the subcellular distribution of ions and proteins in wheat leaves. *Plant Cell Environ.* **2003**, *26*, 1267–1274. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2003.01051.x>.

11. Tasgin, E.; Atici, O.; Nalbantoglu, B.; Popova, L.P. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*. **2006**, *67*, 710-715. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.022>
12. Mühling, K.H.; Läuchli, A. Interaction of NaCl and Cd stress on compartmentation pattern of cations, antioxidant enzymes and proteins in leaves of two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Plant Soil*. **2003**, *253*, 219-231. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1024517919764>.
13. Alves, M.; Francisco, R.; Martins, I.; Ricardo, C.P.P. Analysis of *Lupinus albus* leaf apoplastic proteins in response to boron deficiency. *Plant Soil*. **2006**, *279*, 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-005-3154-y>.
14. Anand, A.; Lei, Z.; Sumner, L.W.; Mysore, K.S.; Arakane, Y.; Bockus, W.W.; *et al.* Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2004**, *17*, 1306-1317. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.12.1306>.
15. Witzel, K.; Shahzad, M.; Matros, A.; Mock, H.P.; Mühling, K.H. Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves. *Plant Methods*. **2011**, *7*, 48. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-48>.
16. Ardila, H.D.; Fernández, R.G.; Higuera, B.L.; Redondo, I.; Martínez, S.T. Protein extraction and gel-based separation methods to analyze responses to pathogens in carnation (*Dianthus caryophyllus* L). In *Plant Proteomics: Methods and Protocols*; 2<sup>nd</sup> ed. Jorrín-Novo, J.; Komatsu, S.; Weckwerth, W.; Wienkoop, S. (Eds.); Humana Press: New York, 2014; pp 573-591. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-631-3\\_39](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-631-3_39).
17. Bodzon-Kulakowska, A.; Bierzynska-Krzysik, A.; Dylag, T.; Drabik, A.; Suder, P.; Noga, M.; *et al.* Methods for samples preparation in proteomic research. *J. Chromatogr. B*. **2007**, *849* (1-2), 1-31. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.040>.
18. Maldonado, A. M.; Echevarría-Zomeño, S.; Jean-Baptiste, S.; Hernández, M.; Jorrín-Novo, J. V. Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *J. Proteomics*. **2008**, *71* (4), 461-72. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.06.012>.
19. Shaw, M. M.; Riederer, B. M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. **2003**, *3*, (8), 1408-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200300471>.
20. Delaunois, B.; Colby, T.; Belloy, N.; Conreux, A.; Harzen, A.; Baillic, F.; *et al.* Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes. *BMC Plant Biol.* **2013**, *13*, 1-24. DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2229-13-24>.
21. Kim, S. G.; Wang, Y.; Lee, K. H.; Park, Z. Y.; Park, J.; Wu, J. *et al.* In-depth insight into in vivo apoplastic secretome of rice *Magnaporthe oryzae* interaction. *J. Proteomics*. **2013**, *78*, 58-71. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.10.029>
22. Higuera, B.L. Contribución al estudio de la participación de los compuestos fenólicos en los mecanismos de la interacción Clavel *Dianthus caryophyllus* L - *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, 2001.
23. Ramírez, 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, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, 2014.
24. Zhang, L.; Tian, L.H.; Zhao, J.F.; Song, Y.; Zhang, C.J.; Guo, Y. Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiol.* **2009**, *149* (2), 916-928. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.108.131144>.
25. Boller, T.; Kende, H. Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiol.* **1979**, *63* (6), 1123-1132. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.63.6.1123>.
26. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
27. Ramagli, L.S.; Rodríguez, L.V. Quantitation of microgram amounts of protein in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis*. **1985**, *6* (11), 559-563. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.1150061109>.
28. Führs, H.; Götze, S.; Specht, A.; Erban, A.; Gallien, S.; Heintz, D.; *et al.* Characterization of leaf apoplastic peroxidases and metabolites in *Vigna unguiculata* in response to toxic manganese supply and silicon. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 1663-78. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erp034>.
29. Alexandersson, E.; Ali, A.; Resjö, S.; Andreasson, E. Plant secretome proteomics. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4* (9). DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00009>
30. Song, Y.; Zhang, C.; Ge, W.; Zhang, Y.; Burlingame, A. L.; Guo, Y. Identification of NaCl stress-responsive apoplastic proteins in rice shoot stems by 2D-DIGE. *J. Proteomics*. **2011**, *74*, 1045-1067. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.009>.
31. Buyel, J. F.; Twyman, R. M.; Fischer, R. Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 902-913. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.010>.
32. Hancock, R. E. W.; Carey, A. M. Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat-2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J. Bacteriol.* **1979**, *140* (3), 902-910.
33. Valero Galván, J.; Valledor, L.; Navarro Cerrillo, R. M.; Gil Pelegrín, E.; Jorrín-Novo, J. V. Studies of variability in Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) through acorn protein profile analysis. *J. Proteomics*. **2011**, *74* (8), 1244-55. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.003>.
34. Curto, M.; Camafeita, L. E.; López, J. A.; Maldonado, A. M.; Rubiales, D.; Jorrín, J. V. A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). *Proteomics*. **2006**, *6* (S1), 163-74. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.200500396>.
35. Castillejo, M.A.; Amiour, N.; Dumas-Gaudot, E.; Rubiales, D.; Jorrín, J. V. A proteome approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobancha crenata*) in pea (*Pisum sativum*). *Phytochemistry*. **2004**, *65* (12), 1817-1828. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.03.029>.

36. Jellouli, N.; Salem, A. B.; Ghorbel, A.; Jouira, H. B. Evaluation of Protein Extraction Methods for *Vitis vinifera* Leaf and Root Proteome Analysis by Two-Dimensional Electrophoresis. *J. Integr. Plant Biol.* **2010**, 52 (10), 933–940. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00973.x>.
37. Carpentier, S. C.; Witters, E.; Laukens, K.; Deckers, P. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*. **2005**, 5, 2497–2507. DOI: <http://doi.org/10.1002/pmic.200401222>
38. Kieffer, P.; Schröder, P.; Dommesb, J.; Hoffmann, L.; Renaut, J.; Hausman, J. F. Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *J. proteomics*. **2009**, 72, 379-396. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.014>
39. Baerenfaller, K.; Grossmann, J.; Grobe, M. A.; Hull, R.; Hirsch-hoffmann, M.; Yalovsky, S.; *et al.* Genome-Scale Proteomics Reveals. *Science* **2008**, 320, 938–941. DOI: <http://doi.org/10.1126/science.1157956>

**Article citation:**

Martínez, A. P.; Martínez, S. T; Ardila, H. D. Condiciones para el análisis electrofórico de proteínas apoplásticas de tallos y raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L) para estudios proteómicos *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, 46 (2), 5-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.62958>



Henry I. Castro-Vargas<sup>1,\*</sup>, Fabián Parada-Alfonso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doctor en Ciencias Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Libre, Seccional Bogotá, Carrera 70 No 53-40, Bogotá D.C., Colombia.

<sup>2</sup>Doctor en Ciencias Química, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Carrera 30 No 45-03, Bogotá D.C., Colombia.

\*Autor para correspondencia: hicastrov@unal.edu.co

Recibido: 5 de Agosto de 2016. Aceptado: 15 de Diciembre de 2016.

## Evaluación del efecto protector contra la oxidación lipídica de fracciones obtenidas a partir del epicarpio de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Sendtn)

### Resumen

Se obtuvieron fracciones a partir del epicarpio de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Sendtn) y se evaluó su efecto protector contra la oxidación lipídica en carne de res cocida (CRC). Un extracto obtenido a través de extracción supercrítica fue fraccionado empleando, a su vez, extracción en fase sólida; dichas fracciones fueron adicionadas a CRC (concentración 200 mg/kg). El efecto protector fue determinado a través de la comparación de algunos productos de oxidación y el antioxidante sintético terbutilhidroquinona (TBHQ, concentración 200 mg/kg). Cuatro fracciones fueron obtenidas, la fracción de mayor polaridad mostró una alta eficiencia para inhibir la oxidación lipídica en CRC, reduciendo la formación de hidroperóxidos HPL y TBARS en 100 y 98,5%, respectivamente; esta mostró una eficiencia superior a la observada para el TBHQ. Esta fracción más activa fue sometida a análisis HPLC-DAD y se identificaron algunos compuestos fenólicos: tres catequinas (epigallocatequina, epicatequina y galato de epigallocatequina) y un ácido fenólico (rosmarínico). Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que el epicarpio de tomate de árbol es fuente de antioxidantes con efecto protector sobre CRC, alternativa de aprovechamiento y valorización para dicho residuo agroindustrial.

**Palabras clave:** epicarpio de tomate de árbol, *Solanum betaceum* Sendtn, oxidación lipídica, actividad antioxidante, extracción con fluidos supercríticos.

## Evaluation of protective effect against lipid oxidation of fractions obtained from tree tomato (*Solanum betaceum* Sendtn) epicarp

### Abstract

Fractions from tree tomato (*Solanum betaceum* Sendtn) epicarp were obtained and their effect against lipid oxidation in cooked beef meat (CBM) was evaluated. An extract obtained by supercritical fluids extraction was fractionated using solid phase extraction and these fractions were added to CBM (at 300 mg/kg). The protector effect against lipid oxidation was determined by measuring some lipid oxidation products and comparison against the synthetic antioxidant tert-butylhydroquinone (TBHQ at 300 mg/kg). Four fractions were obtained, the most polar fraction showed high efficiency to reduce the lipid oxidation on CBM, this fraction reduced the LHP and TBARS formation at 100.0 and 98.5%, respectively. This fraction showed an ability to retard lipid oxidation in CRC higher than TBHQ. The fraction with the highest protector effect was analyzed for its phenolic composition by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection (HPLC-DAD). Three catechin (epigallocatechin, epicatechin and epigallocatechin gallate) and a phenolic acid (rosmarinic acid) were identified. The results revealed that the tree tomato epicarp is a source of antioxidants with protective effect on CBM, an alternative for the use and valorization of this agroindustrial waste.

**Keywords:** Tree tomato epicarp, *Solanum betaceum* Sendtn, lipid oxidation, antioxidant activity, supercritical fluids extraction.

## Avaliação do efeito protetor contra oxidação lipídica de frações obtidas a partir da casca de tomate da árvore (*Solanum betaceum* Sendtn)

### Resumo

Frações da casca de tomate de árvore (*Solanum betaceum* Sendtn) foram obtidas e seu efeito para retardar a oxidação dos lipídios em carne bovina cozida (CBC) foi avaliado. Um extrato obtido através da extração supercrítica foi fracionado utilizando extração em fase sólida e as frações obtidas foram adicionadas à CBC (concentração 300 mg/kg). O efeito protetor contra a oxidação dos lipídios foi determinado medindo alguns produtos de oxidação e comparando com a terbutil-hidroquinona (TBHQ, concentração 300 mg/kg). Quatro frações foram obtidas, destas, a fração de maior polaridade mostrou a maior eficiência para inibir a oxidação dos lipídios da CBC, reduzindo a formação de HPL e TBARS em 100 e 98,5%, respectivamente; mostrou uma eficiência maior da observada para TBHQ. Esta foi submetida a análise por a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de díodos (HPLC-DAD) e foram identificados alguns compostos fenólicos: três catequinas (epigallocatequina, galato de epicatequina e galato de epigallocatequina) e um ácido fenólico (rosmarínico). Os resultados permitiram evidenciar que a casca do tomate de árvore é uma fonte de compostos antioxidantes como protetor sobre a CBC, esta é uma alternativa de utilização e aproveitamento desse resíduo agroindustrial.

**Palavras-Chave:** casca de tomate de árvore, *Solanum betaceum* Sendtn, oxidação dos lipídios, atividade antioxidante, extração supercrítica.

## Introducción

El tomate de árbol (*Solanum betaceum* Sendtn) es un fruto tropical nativo de los Andes del Perú, Ecuador y Colombia. Actualmente se conocen tres ecotipos de tomate de árbol diferenciados por su color: amarillo, rojo y púrpura (1); en Colombia los más comunes son el amarillo y el rojo. Colombia, Brasil, Nueva Zelanda, Kenia, Sudáfrica, Estados Unidos (California), India y Sri Lanka son los principales productores y exportadores mundiales de tomate de árbol, al respecto, Colombia en el año 2013 produjo 146265 ton (2). El tomate de árbol es conocido por su valor nutricional debido a que es una buena fuente de nitrógeno, fósforo y potasio (3). Otros metabolitos de importancia biológica han sido también identificados y cuantificados en el fruto, tal es el caso de carotenoides (4, 5) y polisacáridos (6, 7), en el ecotipo amarillo, y antocianinas en el ecotipo rojo (8-10). Algunos de estos compuestos (p.e. antocianinas y otros compuestos fenólicos) hacen del fruto una fuente de antioxidantes. Dicha actividad antioxidante (AA) de extractos de tomate de árbol ha sido evaluada frente a radicales como el DPPH y el ABTS<sup>+</sup> (11, 12) y en la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (13).

Ahora bien, la oxidación lipídica es uno de los procesos más relevantes en el deterioro de algunos alimentos, genera sabores y aromas desagradables, disminución del tiempo de vida útil, pérdida de la calidad nutricional y formación de compuestos altamente tóxicos (14, 15). Dicho proceso se puede controlar por medio de antioxidantes y, en el caso particular de Colombia, la industria alimentaria usa antioxidantes sintéticos como el ácido eritórbito y la terbutil-hidroquinona (TBHQ), pues son relativamente económicos y bastante eficientes. Sin embargo, dichos compuestos sintéticos han sido muy juzgados por sus efectos nocivos sobre la salud de los consumidores (16, 17). Por tanto, una alternativa en la protección de alimentos frente a la oxidación lipídica es el uso de extractos, fracciones o compuestos obtenidos a partir de fuentes naturales como frutas y vegetales, estos han demostrado ser muy eficientes, además de proporcionar un carácter funcional a los alimentos (18). El epicarpio de tomate de árbol es una de esas fuentes naturales alternativa, estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que extractos supercríticos (obtenidos a diferentes presiones y temperaturas) provenientes de dicho residuo poseen un potente efecto protector frente a la oxidación lipídica en carne de res cocida (CRC) (19).

En Colombia, el consumo interno del tomate de árbol está enfocado a su uso en fresco, elaboración de jugos y conservas y obtención de algunos productos procesados; este uso involucra de forma exclusiva a la pulpa del fruto, descartando como residuos sus semillas y su epicarpio. En el caso particular del epicarpio, este residuo puede alcanzar hasta 5% en peso fresco relativo al fruto, esta es una cantidad significativa de material vegetal que, en la actualidad, posee pocas opciones de uso o aprovechamiento. Los antecedentes muestran que los residuos agroindustriales, en particular el epicarpio de tomate de árbol, son fuentes importantes de antioxidantes (18, 19), lo que plantea una alternativa para el aprovechamiento y valorización de dichas biomásas.

Dado lo anterior, el presente trabajo exploró una alternativa de uso para el epicarpio de tomate de árbol como fuente de fracciones (antioxidantes) capaces de atenuar de forma eficiente la oxidación lipídica en CRC. Para esto, un extracto obtenido a partir de epicarpio de tomate de árbol, empleando extracción con fluidos supercríticos (EFS), fue sometido a fraccionamiento y las fracciones fueron adicionadas como antioxidantes a CRC.

La eficiencia de las fracciones para atenuar la oxidación lipídica en CRC fue comparada con al antioxidante sintético TBHQ. Finalmente, algunos compuestos fenólicos fueron identificados en la fracción con mayor eficacia.

## Materiales y métodos

### Reactivos y estándares

El dióxido de carbono fue proporcionado por White Martins Praxair Inc (Joinville-SC, Brasil). Los disolventes orgánicos (metanol, etanol, cloroformo, hexano e isooctano) y ácidos (clorhídrico y tricloroacético) fueron proporcionados por Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro-RJ, Brasil). El ácido tiobarbitúrico fue obtenido de Alfa Aesar (Lancashire, UK). El 1,1,3,3-tetraetoxipropano fue proporcionado por Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis-MO, USA). El antioxidante comercial para alimentos TBHQ fue proporcionado Kemin Food Technologies. Para la identificación de los compuestos fenólicos se emplearon patrones certificados de ácidos fenólicos (gálico, phidroxibenzoico, vanílico, ferúlico y cinámico), catequinas (catequina, galato de epigallocatequina, epicatequina, galato de epicatequina y epigallocatequina) y flavonoides (ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico, quercetina, naringenina, luteolina, kaempferol, ácido ursólico y pinocembrina), estos fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (St. Louis-MO, USA).

### Muestras y preparación

El epicarpio de tomate de árbol, ecotipo amarillo, fue proporcionado por Alimentos SAS S.A. (Bogotá, Colombia). Este correspondía al residuo generado en la producción de pulpa a partir del fruto. El corte de carne de res empleado fue morrillo con un contenido de grasa de 30% en peso fresco, fue adquirido en un mercado local de Bogotá. El epicarpio fue removido de residuos de pulpa y semillas y lavado con agua corriente, posteriormente se secó a temperatura ambiente por 72 h (humedad final  $0,20 \pm 0,01\%$ ). La muestra seca fue sometida a molienda y posteriormente separada por tamaño de partícula en agitador vibratorio vertical (Bertel Metalurgic Ind. Ltda., Caieiras-SP, Brasil); el tamaño medio de partícula final fue  $0,278 \pm 0,008$  mm. Por otra parte, la muestra de carne ( $\approx 10$  kg) fue lavada con abundante agua y se le removió el tejido conectivo y la grasa externa. Luego se dividió por cuarteos sucesivos, hasta obtener 16 fracciones de  $600 \pm 5$  g que fueron cortadas en cubos de  $1 \text{ cm}^3$  y mezclados aleatoriamente.

### Obtención de extracto

La muestra de epicarpio de tomate de árbol fue sometida a extracción con fluidos supercríticos (EFS) empleando una unidad de extracción dinámica descrita por Danielski *et al.* (20) y siguiendo la metodología descrita por Castro-Vargas *et al.* (19). El extracto fue obtenido empleando como disolvente dióxido de carbono, adicionado con etanol (EtOH) como cosolvente ( $\text{CO}_2/\text{EtOH}$ ) a un flujo constante de  $0,50 \pm 0,05$  kg/h. Las condiciones de extracción fueron: presión 30 MPa, temperatura  $50 \pm 1$  °C y 2% en peso (respecto al  $\text{CO}_2$ ) de cosolvente. El tiempo de extracción empleado fue 210 min, tiempo establecido por medio de ensayos cinéticos (curvas de extracción) a las condiciones antes citadas. Todas las condiciones fueron establecidas a partir de estudios previos (19, 21). Estas condiciones permitieron obtener un extracto con alta eficiencia para retardar la oxidación lipídica en CRC.

## Obtención de fracciones

El extracto obtenido fue fraccionado empleando un cartucho de extracción en fase sólida empacado con 2,0 g de sílica modificada, diol, como fase estacionaria (HyperSep™ Diol, 40-60  $\mu$ m). Se inyectaron en el cartucho 300 mg de extracto, previamente liofilizado, disuelto en una mezcla hexano/acetato de etilo (1:9). Los compuestos fueron eluidos empleando un gradiente de hexano/acetato de etilo a un flujo 1 mL/min. Cuatro fracciones fueron obtenidas, rotuladas como F1 a F4, correspondientes a diferentes composiciones de hexano/acetato de etilo (1:9, 3:7, 6:4 y 8:2); para cada una se usaron 25 mL de fase móvil. Todas las fracciones fueron concentradas en rotavapor y liofilizadas evaluando su rendimiento; posteriormente fueron reconstituidas en EtOH y se evaluó su efecto contra la oxidación lipídica en CRC.

## Oxidación lipídica en CRC

El efecto protector contra la oxidación lipídica o actividad antioxidante (AA) del extracto crudo y las fracciones de epicarpio de tomate de árbol fue evaluado en CRC y comparado frente al antioxidante sintético TBHQ (19).

### Preparación de carne de res cocida y almacenamiento

La carne de res (CR) fue molida en licuadora a máxima velocidad usando ciclos cortos hasta obtener un paté homogéneo. Porciones de  $20 \pm 0,01$  g de paté fueron ubicadas en tubos Falcon ámbar y se llevaron a cocción en baño de agua a  $75 \pm 1$  °C, hasta alcanzar una temperatura interna de  $65 \pm 1$  °C (aproximadamente 40 min), obteniendo la CRC. El extracto crudo, las fracciones y el TBHQ fueron adicionados de forma independiente a muestras de CRC hasta alcanzar una concentración final de  $200 \pm 0,5$  mg/kg (22).

Muestras control fueron preparadas de forma similar adicionando  $10 \pm 0,1$   $\mu$ L de etanol sin antioxidantes. Un grupo de muestras de CRC sin antioxidantes fue sometido a análisis inmediato (día cero), mientras que las otras muestras adicionadas con el extracto, fracciones y TBHQ fueron almacenadas a 4 °C por 9 días. Cada grupo de muestras (día cero, control, adicionadas con extracto, fracciones o TBHQ) involucró seis replicas. La oxidación lipídica en CRC fue determinada por cuantificación de hidroperóxidos lipídicos (HPL) y las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Los resultados son presentados como la diferencia en el contenido de HPL y TBARS entre los días 0 y 9, respectivamente.

### Medición de hidroperóxidos lipídicos

La formación de HPL fue evaluada por el método de dienos conjugados (23, 24). La CRC fue sometida a extracción de los hidroperóxidos empleando una mezcla de hexano:metanol (1:1); la fracción apolar fue concentrada en vacío y los HPL fueron disueltos en isooctano. Posteriormente se midió la absorbancia de la disolución a 234 nm (VARIAN Cary® 50 UV-Vis, Palo Alto-CA, USA). La concentración de HPL fue calculada usando el coeficiente de extinción molar de los hidroperóxidos del ácido linoleico ( $\xi = 26000$  M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>) (25); los resultados son expresados como mmol de HPL por kilogramo de CRC (mmol HPL/kg).

### Medición de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

Las TBARS fueron medidas con base en reportes previos con ligeras modificaciones (26-28). Se tomaron muestras de 500 mg de CRC en tubos Falcon y se adicionaron sucesivamente:

50  $\mu$ L de una disolución de butilhidroxitolueno (23 mM),  $1,5 \pm 0,1$  mL de disolución de ácido tiobarbitúrico (26 mM) y 10,0 mL de ácido tricloroacético (0,3 M en HCl 0,2 M). La mezcla se agitó en vortex por 30 s y se ubicó en baño de agua en ebullición por 40 min, después se detuvo la reacción sumergiendo los tubos en un baño de hielo. Se tomaron  $5,0 \pm 0,1$  mL de la suspensión resultante y se mezcló con  $5,0 \pm 0,1$  mL de cloroformo, se agitó en vortex y se centrifugó (Hettich® Universal 320/320R, Tuttlingen, Germany) a 5500 rpm por 20 min (3348 g). Se tomó la fase acuosa y se determinó su absorbancia a 532 nm (VARIAN Cary® 50 UV-Vis, Palo Alto-CA, USA). Los resultados obtenidos son expresados en términos de mg de malondialdehído (MDA) por kilogramo de CRC (mg MDA/Kg). Para esto se preparó una curva de calibración MDA ( $0,036 \mu$ M a  $0,185 \mu$ M) obtenido por hidrólisis de 1,1,3,3-tetraetoxipropano.

## Análisis de compuestos fenólicos

La fracción que presentó la mayor AA en CRC fue sometida a análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia con detección por arreglo de diodos (HPLC-DAD). Para esto se empleó un cromatógrafo Agilent Technologies Serie 1200 (Palo Alto-CA, USA). La separación se realizó en una columna en fase reversa KINETEX C18 Phenomenex (100 mm x 4,6 mm x 2,6  $\mu$ m) mantenida a 35 °C. La fase móvil usada fue ácido acético al 0,3% *p/p* (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) a un flujo constante de 1 mL/min. Durante la separación se empleó el siguiente gradiente de elución: inicio con 95,5% de A y 4,5% de B durante 13 min; luego la concentración de B fue incrementada hasta 15% en 1 min, manteniéndola constante por 3 min; después la concentración de B fue incrementada hasta 22% a una velocidad de 2,3%/min, manteniéndola constante por 8 min; finalmente la concentración de B fue llevada a 100% en 2 min. La inyección de la muestra consistió en 10  $\mu$ L de una disolución de la fracción de 5000 ppm. Algunos compuestos fenólicos fueron identificados por comparación de sus espectros UV y sus tiempos de retención frente a compuestos puros (ácidos fenólicos, catequinas y flavonoides).

## Análisis estadísticos

Los ensayos de AA fueron realizados bajo un diseño experimental completamente aleatorio, los resultados son presentados como la media y su desviación estándar, obtenidos a partir de seis repeticiones. Un análisis de varianzas (ANOVA) de una vía (95% de confianza) fue realizado con el objetivo de evidenciar diferencias significativas en la AA del extracto, las fracciones y el TBHQ. Todos los análisis fueron ejecutados empleando el software R (Version 2.13.0).

## Resultados y discusión

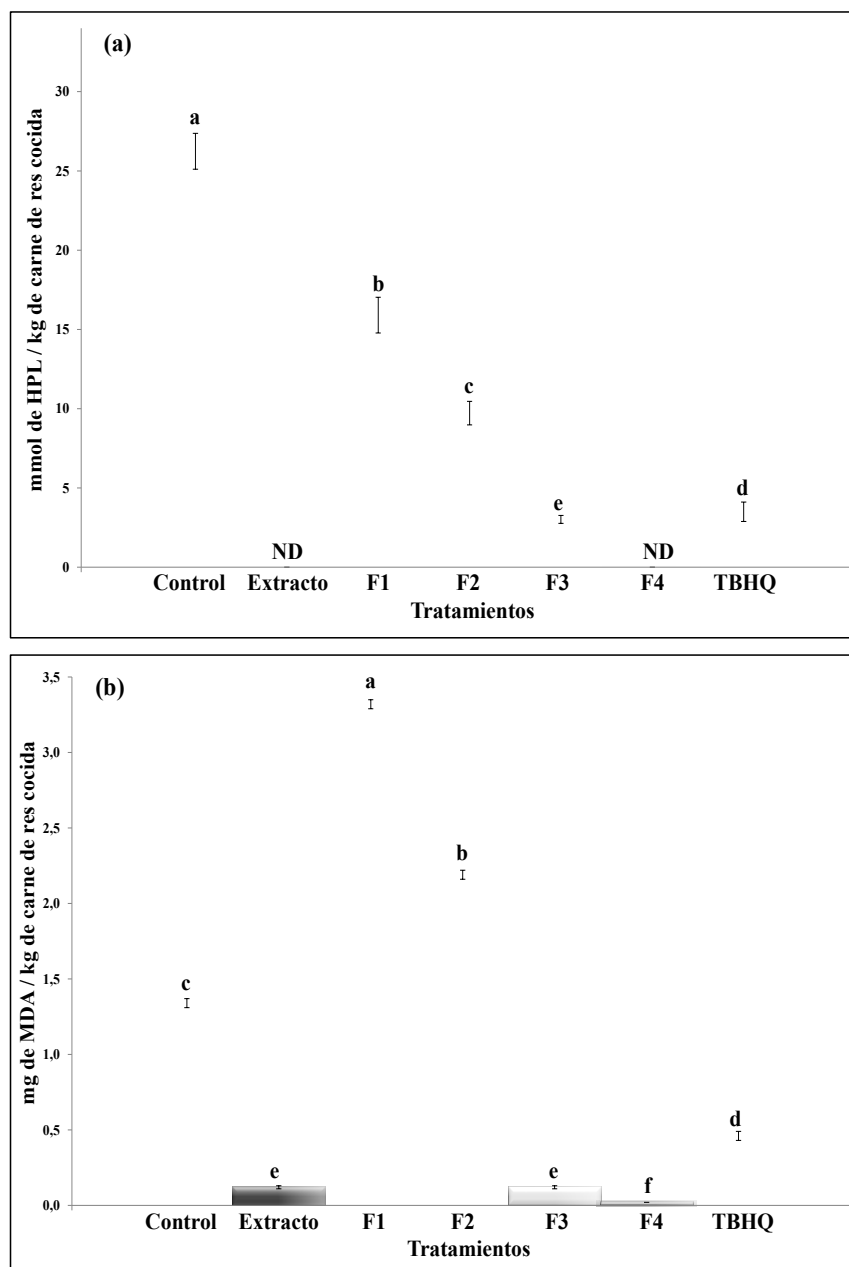
Trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación abordaron la obtención de extractos con AA a partir de epicarpio de tomate de árbol empleando EFS. Los resultados obtenidos proporcionaron la condición de extracción más adecuada para obtener un extracto con alta AA en CRC (CO<sub>2</sub> a 30 MPa, 50 °C y 2% de EtOH como cosolvente) (19). Dicho extracto fue sometido a fraccionamiento con el fin de separar algunos de los compuestos responsables de la AA observada, al mismo tiempo se buscó mejorar el efecto protector sobre la CRC por medio de uso de las fracciones.

Se obtuvieron cuatro fracciones (F1 a F4), la más abundante fue F1 con un 69% en peso relativo al extracto, seguida por F2 con 12,5%, F3 con 8,5% y F4 con 7%, el 3% del extracto fue perdido por adhesión a la columna. Todas las fracciones fueron adicionadas de forma independiente a CRC y su AA fue evaluada.

### Oxidación lipídica en carne de res cocida

La eficiencia de las fracciones para retrasar la oxidación lipídica en CRC o AA fue evaluada y comparada contra el TBHQ y el extracto crudo, las concentraciones de HPL y TBARS presentes en las muestras de CRC tratadas son presentadas en la Figura 1.

La mayor AA fue presentada por F4 que inhibió la formación de HPL en CRC en un 100% respecto al CONTROL. La muestra de CRC, adicionada con dicha fracción, no presentó diferencias significativas (siglas ND en la Figura 1a) en la concentración de HPL entre los días cero y nueve de almacenamiento. Un resultado similar fue observado para las TBARS (Figura 1b): F4 minimizó su formación en un 98,5% en comparación al CONTROL (0,02 mg MDA/kg respecto a 1,34 mg MDA/kg). La F3 también presentó una buena AA, pues redujo la formación de HPL y TBARS en 88,5 y 91,0%, respectivamente. Por su parte las fracciones F1 y F2 no mostraron una AA importante, por el contrario, ejercieron un efecto prooxidante sobre la formación de TBARS en CRC.



**Figura 1.** Concentración de hidroperóxidos lipídicos (a) y especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (b) presentes en las muestras de carne de res cocida tratadas con el extracto crudo, las fracciones (F1 a F4) y el antioxidante TBHQ. ND: no existen diferencias en la concentración entre los días cero y nueve de almacenamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

Al comparar la AA de F4 frente a la observada en el extracto crudo se evidencia que dicha fracción posee una mayor eficiencia para atenuar la formación de TBARS en CRC. F4 mostró una habilidad seis veces mayor para reducir la formación de TBARS respecto a la presentada por el extracto crudo (0,020 mg MDA/kg en la muestra de CRC adicionada con F4 respecto a 0,120 mg MDA/kg en la muestra de CRC adicionada con el extracto crudo). Esto muestra que el fraccionamiento del extracto fue un proceso eficiente ya que permitió separar en una fracción (F4) algunos de los compuestos con mayor AA presentes en el extracto crudo.

El antioxidante sintético TBHQ mostró una AA inferior a la observada en el extracto crudo, F3 y F4, esto sugiere que dichos productos obtenidos a partir del epicarpio de tomate de árbol podrían ser empleados en la conservación de productos cárnicos en reemplazo del TBHQ, obteniendo una alta protección frente a la oxidación lipídica y reduciendo los riesgos asociados a la presencia de sustancias de origen sintético.

Teniendo en cuenta los resultados observados en la evaluación de la AA de las diferentes fracciones, la F4 fue sometida a análisis por HPLC-DAD con el propósito de identificar algunos compuestos fenólicos responsables del efecto protector observado.

### Identificación de compuestos fenólicos

La fracción F4 fue sometida a análisis por HPLC-DAD; en la Figura 2 se presentan el cromatograma obtenido a 245 nm. La comparación de los tiempos de retención y espectros UV-Vis de los compuestos separados a partir de F4 contra compuestos puros permitió identificar cuatro compuestos en F4: epigallocatequina (EGC, pico 1), epicatequina (EC, pico 2), galato de epigallocatequina (GEGC, pico 3) y ácido rosmarínico (AR, pico 4). De los compuestos identificados, el AR ha sido previamente reportado en pulpa de tomate de árbol ecotipo amarillo (29), sin embargo, no se encontraron reportes sobre la identificación de los demás compuestos en el fruto.

La AA del AR en CRC ha sido previamente reportada en la literatura (30); la adición de 500 ppm de AR en forma de rosmarínato inhibió totalmente la formación de TBARS en CRC durante su almacenamiento a 4 °C por 14 días.

Respecto a EGC, EC y GEGC, actualmente no existen reportes en la literatura relacionados con la AA en CRC o matrices similares (carne cocidas). Sin embargo, la AA de dichos compuestos ha sido evaluada en matrices menos complejas como emulsiones agua/aceite observándose una reducción de la formación de HPL y TBARS mayores a 50%, relativo al control (31, 32). Estos resultados muestran que los compuestos fenólicos identificados en F4 presentan un buen comportamiento como agentes protectores contra la oxidación lipídica, lo que permite considerar que su aporte a la AA en CRC observada para F4 debe ser significativo.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el epicarpio de tomate de árbol es un residuo agroindustrial altamente promisorio para la obtención de antioxidantes con gran eficiencia para retardar la oxidación lipídica en alimentos como CRC. Teniendo en cuenta esto, el epicarpio de tomate de árbol se presenta como una fuente de extractos, fracciones o compuestos con potencial aplicación en la conservación de productos cárnicos similares. Esta alternativa de aprovechamiento podría beneficiar la cadena productiva del fruto, al proporcionarle un valor agregado generado por la comercialización de los extractos o fracciones del epicarpio. Las industrias procesadoras de tomate de árbol también podrían verse beneficiadas al comercializar el residuo, obteniendo así un ingreso adicional. Por su parte, la industria procesadora de carne dispondría de un aditivo alternativo para conservar sus productos, el cual reemplazaría los actuales, incrementaría la vida útil de sus productos y les proporcionaría un carácter funcional.

Cuatro fracciones fueron obtenidas, de estas la de mayor polaridad, F4, mostró una eficiencia para inhibir la formación de HPL y TBARS en CRC muy cercana al 100%. En comparación con el extracto crudo y el antioxidante sintético TBHQ, F4 presentó una AA notablemente superior. Finalmente, tres catequinas y un ácido fenólico fueron identificados en F4, estos compuestos probablemente aportaron de forma significativa a la AA observada.

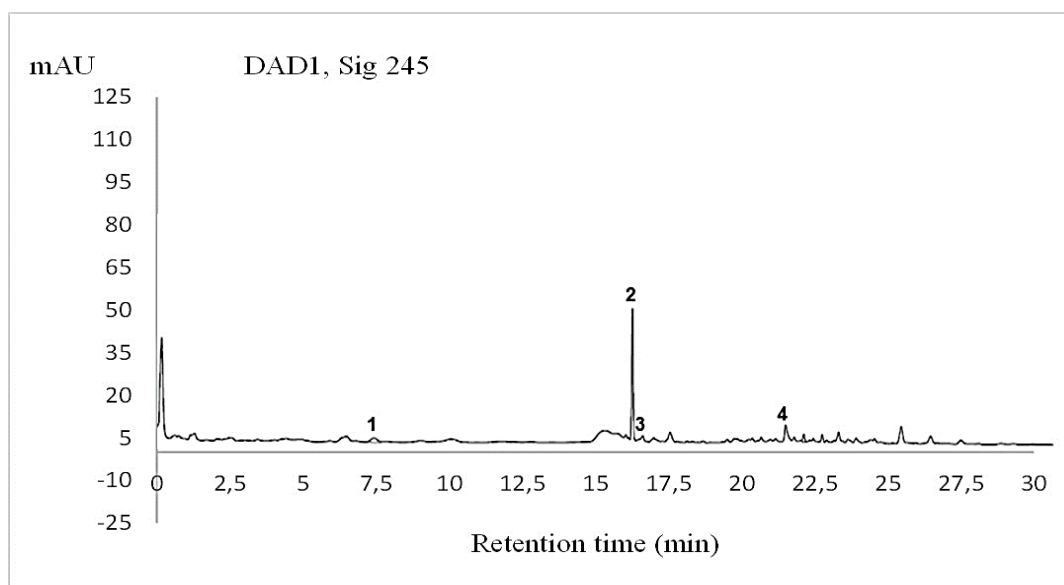


Figura 2. Cromatograma obtenido en el análisis por CLAE-DAD de F4 a 245 nm

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia y a la Red Nacional para la Bioprospección de Frutas Tropicales-RIFRUTBIO (proyecto 550854332012, COLCIENCIAS) por su apoyo económico, también a alimentos SAS S.A. por proporcionarnos el material vegetal.

## Referencias

- Vasco, C.; Avila, J.; Ruales, J.; Svanberg, U.; Kamal-Eldin, U. Physical and chemical characteristics of golden-yellow and purple-red varieties of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2009**, *60*, 278-288. DOI: <https://doi.org/10.1080/09637480903099618>.
- Cámara de comercio de Bogotá, Vicepresidencia de Fortalecimiento Empresarial, Manual del Tomate de Árbol, Programa de Apoyo Agrícola y Agroindustrial, 2015, pp 34-36.
- Clark, C.; Richardson, A. Biomass and mineral nutrient partitioning in a developing tamarillo (*Cyphomandra betacea*) crop. *Sci. Hortic.* **2002**, *94*, 41-51. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00355-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00355-7).
- Rodríguez-Amaya, D.B.; Bobbio, P.A.; Bobbio, F.A. Carotenoid composition and vitamin A value of the Brazilian fruits *Cyphomandra betacea*. *Food Chem.* **1983**, *12*, 61-65. DOI: [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(83\)90050-X](https://doi.org/10.1016/0308-8146(83)90050-X).
- De Rosso, V.; Mercadante, A. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9135-9141. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf071316u>.
- do Nascimento, G.; Corso, C.; Werner, M.; Baggio, C.; Iacomini, M.; Cordeiro, L. Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *116*, 300-306. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.032>.
- do Nascimento, G.; Hamm, L.; Baggio, C.; Werner, M.; Iacomini, M.; Cordeiro, L. Structure of a galactoarabinoglucuronoxylan from tamarillo (*Solanum betaceum*), a tropical exotic fruit, and its biological activity. *Food Chem.* **2013**, *141*, 510-516. DOI: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613003257>.
- Osorio, C.; Hurtado, N.; Dawid, C.; Hofmann, T.; Heredia-Mira, F.J.; Morales, A.L. Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1915-1921. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.026>.
- Mertz, C.; Gancel, A.; Gunata, Z.; Alter, P.; Dhuique-Mayer, C.; Vaillant, F.; et al. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. *J. Food Compos. Anal.* **2009**, *22*, 381-387. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2008.06.008>.
- Wrolstad, R.E.; Heatherbell, D.A. Identification of anthocyanins and distribution of flavonoids in tamarillo fruit (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). *J. Sci. Food Agric.* **1974**, *15*, 1221-1228. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2740251005>.
- Ordoñez, R.M.; Cardozo, M.L.; Zampini, I.C.; Isla, M.I. Evaluation of antioxidant activity and genotoxicity of alcoholic and aqueous beverages and pomace derived from ripe fruits of *Cyphomandra betacea* Sendt. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 331-337. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf9024932>.
- Sánchez, W.F.; Murillo, E.; Méndez, J.J. Antioxidant potential of agroindustrial residues from three high consumption fruits in Tolima. *Scientia et Technica* **2010**, *46*, 138-143.
- Kou, M.C.; Yen, J.H.; Hong, J.T.; Wang, C.L.; Lin, C.W. et al. *Cyphomandra betacea* Sendt. phenolics protect LDL from oxidation and PC12 cells from oxidative stress. *LWT-Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 458-463. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.09.010>.
- Gordon, M.H. The development of oxidative rancidity in foods. In *Antioxidants in food Practical applications*; Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon M., Ed.; CRC Press, Boca Raton, 2001; pp 7-20.
- Cross, H.; Leu, R.; Miller, M.F. Scope of warmed-over-flavor and its importance to the meat industry. In *Warmed-over-flavor of meat*; St. Angelo, A.J.; Bailey M.E., Ed.; Academic Press, Orlando, 1987; pp 1-18.
- Eskandani, M.; Hamishehkar, H.; Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chem.* **2014**, *153*, 315-320. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.087>.
- Kashanian, S.; Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. DNA binding studies of 2-tertbutylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chem.* **2009**, *116*, 743-747. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.027>.
- Contreras-Calderón, J.; Calderón-Jaimes, L.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 2047-2053. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.003>.
- Castro-Vargas, H.I.; Benelli, P.; Ferreira, S.R.S.; Parada-Alfonso, F. Supercritical fluid extracts from tamarillo (*Solanum betaceum* Sendtn) epicarp and its application as protectors against lipid oxidation of cooked beef meat. *J. Supercrit. Fluids* **2013**, *76*, 17-23. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2012.10.006>.
- Danielski, L.; Michielin, E.M.Z.; Ferreira, S.R.S. Horsetail, (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO<sub>2</sub>: experimental solubility and empirical data correlation. *J. of Food Eng.* **2007**, *78*, 1054-1059. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.12.016>.
- Castro Vargas, H.I. Obtención de antioxidantes a partir de residuos frutícolas empleando extracción con fluidos supercríticos. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia, Noviembre 2013.
- World Health Organization-WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO, Codex Alimentarius, Norma general del Codex para los aditivos alimentarios, Codex Stan 192-1995, Revision 2009. Antioxidantes en carnes y derivados cárnicos, WHO/FAO 2009.
- Juntachote, T.; Berghofer, E.; Siebenhandl, S.; Bauer, F. The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. *Meat Sci.* **2006**, *72*, 446-456. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.08.009>.
- Frankel, E.; Huang, S.W.; Kanner, J.; German, J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1054-1059. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf00041a001>.

25. Chan, H.; Levett, G. Autoxidation of Methyl Linoleate. Separation and Analysis of Isomeric Mixtures of Methyl Linoleate Hydroperoxides and Methyl Hydroxylinoleates. *Lipids* **1977**, *12*, 99-104. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf02532979>.
26. Wang, L.L.; Xiong, Y.I. Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9186-9192. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf051213g>.
27. Maraschiello, C.; Sárraga, C.; García Regueiro, J.A. Glutathione peroxidase activity, TBARS, and  $\alpha$ -tocopherol in meat from chickens fed different diets. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 867-872. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf980824o>.
28. Lee, B.J.; Hendricks, D.G.; Cornforth, D.P. A comparison of carnosine and ascorbic acid on color and lipid stability in a ground beef pattie model system. *Meat Sci.* **1999**, *51*, 245-253. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)00121-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00121-1).
29. Espin, S.; Gonzalez-Manzano, S.; Taco, V.; Poveda, C.; Ayuda-Durán, B.; Gonzalez-Paramas, A.M.; *et al.* Phenolic composition and antioxidant capacity of yellow and purple-red Ecuadorian cultivars of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chem.* **2016**, *194*, 1073-1080. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.131>.
30. Allen, K.; Cornforth, D. Comparison of spice-derived antioxidants and metal chelators on fresh beef color stability. *Meat Sci.* **2010**, *85*, 613-619. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.03.012>.
31. Almajano, P.; Delgado, E.; Gordon, M. Albumin causes a synergistic increase in the antioxidant activity of green tea catechins in oil-in-water emulsions. *Food Chem.* **2007**, *102*, 1375-1382. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.067>.
32. Huang, S.; Frankel, E. Antioxidant Activity of Tea Catechins in Different Lipid Systems. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3033-3038. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf9609744>.

**Article citation:**

Castro-Vargas, H. I.; Parada-Alfonso, F. Evaluación del efecto protector contra la oxidación lipídica de fracciones obtenidas a partir del epicarpio de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Sendtn) *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, *46* (2), 17-23. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.62988>



Adriana M. Zamudio S.<sup>1,\*</sup>, Nicolás Vanoy V.<sup>1</sup>, Consuelo Díaz-Moreno<sup>2</sup>,  
Diego A. Ahumada F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inocuidad Química. Centro de Bio-Sistemas. Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá D.C.

<sup>2</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.

<sup>3</sup>Subdirección de metrología Química y Biomedicina. Instituto Nacional de Metrología de Colombia

\*Autor para correspondencia: [adriana.zamudio@utadeo.edu.co](mailto:adriana.zamudio@utadeo.edu.co)

Recibido: 11 de Septiembre de 2016. Aceptado: 25 de Enero de 2017.

## Desarrollo y validación de un método multiresiduo para el análisis de plaguicidas en miel por UFLC-MS

## Development and validation of a multiresidue method for pesticide analysis in honey by UFLC-MS

## Desenvolvimento e validação de um método de resíduos múltiplos para o análise de agrotóxicos em mel por UFLC-MS

### Resumen

Se desarrolló un método para la determinación de residuos de plaguicidas en miel de abejas mediante cromatografía líquida ultra rápida acoplada a espectrometría de masas (cuádruplo sencillo). Se partió del método QuEChERS, evaluando las siguientes variables: (i) cantidad de muestra, (ii) tipo de sal para el control de pH, (iii) valor de pH del buffer y (iv) mezclas de limpieza. Adicionalmente y con el propósito de demostrar la confiabilidad del método, se evaluaron diferentes parámetros como exactitud, límites de detección y cuantificación, linealidad y selectividad. Los resultados mostraron que, mediante las modificaciones realizadas, se logró obtener un método más selectivo y se mejoró la exactitud de 19 plaguicidas respecto al método QuEChERS original. Por otro lado, mediante el proceso de validación, se encontró que el método es apto para el análisis de 50 plaguicidas (de 56 que se emplearon). Se obtuvieron porcentajes de recuperación entre el 70 y 120% y coeficientes de variación inferiores al 15%.

**Palabras clave:** plaguicidas, QuEChERS, miel, validación.

### Abstract

A method for the determination of pesticide residues in honey by ultra fast liquid chromatography coupled with mass spectrometry was developed. For this purpose, different variations of the QuEChERS method were performed: (i) amount of sample, (ii) type of salt to control pH, (iii) buffer pH, and (iv) different mixtures for cleaning-up. In addition, to demonstrate that the method is reliable, different validation parameters were studied: accuracy, limits of detection and quantification, linearity, and selectivity. The results showed that by means of the changes introduced it was possible to get a more selective method that improves the accuracy of about 19 pesticides selected from the original method. It was found that the method is suitable for the analysis of 50 pesticides, out of 56. Furthermore, with the developed method recoveries between 70 and 120% and relative standard deviation below 15% were found.

**Keywords:** pesticides, QuEChERS, honey, validation.

### Resumo

Foi desenvolvido um método para a determinação de resíduos de pesticidas no mel por cromatografia líquida ultrarrápida acoplada à espectrometria de massa. Para este efeito, foram realizadas diferentes variações do método QuEChERS: (i) quantidade de amostra, (ii) tipo de sal para o controle do pH, (iii) valor do pH do tampão, (iv) diferentes misturas de limpeza. Além disso, a fim de demonstrar que o método é confiável, diferentes parâmetros foram validados como: precisão, limite de detecção e quantificação, linearidade e seletividade. Os resultados mostraram que, por meio das modificações é possível obter um método mais seletivo que melhora a precisão de cerca de 19 pesticidas selecionados, respeito ao método original. Adicionalmente, foi determinado que a validação do método estabeleceu que este é adequado para a análise de 50 pesticidas (56 foram utilizados). Foram obtidos percentagens de recuperação entre 70 e 120% e coeficientes de variação menores ao 15%.

**Palavras-Chave:** pesticidas, QuEChERS, mel, validação

## Introducción

El sector apícola está relacionado con el desarrollo natural de los ecosistemas y con el avance económico a nivel agrícola y pecuario, puesto que tiene función protagónica en la polinización y, por tanto, en la sustentabilidad de la producción agrícola. Del mismo modo, es importante por el valor nutricional de sus productos. Dada su importancia para la agricultura, su desarrollo es imprescindible para alcanzar la seguridad y soberanía alimentaria que requiere el país (producción de alimentos, cantidad, calidad, inocuidad, trazabilidad y sostenibilidad), pues a medida que se incrementa el desarrollo apícola, se aporta mayor beneficio ambiental, económico y social para todo el sector agrícola. Pese a su importancia, la apicultura enfrenta importantes retos productivos causados, principalmente, por el efecto antrópico en los ecosistemas y el cambio climático (1).

Siguiendo con la importancia de la apicultura, gracias a la polinización entomófila se mantiene aproximadamente un tercio de los cultivos y la mayor parte de la flora silvestre (2). Se calcula que en los últimos años la polinización ha representado un beneficio económico global alrededor de los 265 mil millones de euros, correspondientes al precio de las cosechas que dependen de la polinización natural; se estima que sin esta herramienta se bajaría la productividad agrícola hasta en un 75% (2).

Así bien, para efectuar el proceso de polinización, entre 10000 y 25000 abejas obreras realizan en promedio diez viajes por día, para lo cual exploran aproximadamente un radio de 3 km en los alrededores de su hábitat (3,4). Durante este proceso, microorganismos, sustancias químicas y partículas en el aire entran en contacto con ellas (5). Por lo anterior, las abejas y los productos de la colmena sirven como bioindicadores para el monitoreo de plagas, contaminación de origen industrial o urbano y/o prácticas agrícolas que puedan ser perjudiciales (6).

Entre dichas prácticas agrícolas se encuentra el control químico de plagas, de mayor impacto para el ecosistema, pues trae como principal consecuencia un aumento en la frecuencia y dosis de exposición a pesticidas por parte de las abejas. Por lo anterior, la actual regulación para plaguicidas químicos no solo está orientada a la protección del consumidor, sino que también busca la protección de las abejas como principales polinizadores en la naturaleza (2).

Ahora bien, el análisis de residuos contaminantes orgánicos en productos apícolas se realiza mediante dos tipos de métodos: los presuntivos y los de confirmación. En el primer grupo se encuentran los inmunoensayos y los métodos microbiológicos. En el segundo los métodos de confirmación que, según el Codex Alimentarius, se basan en técnicas instrumentales avanzadas como la electroforesis capilar y la cromatografía líquida de alta eficiencia acopladas a espectrometría de masas (HPLC-MS) (7, 8). Diferentes entes de control como la Administración de medicamentos y alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) y la Unión Europea han establecido la necesidad de contar con métodos que permitan realizar la cuantificación y confirmación de los residuos (7, 8, 21, 22), por lo cual los métodos instrumentales tienen mayor ventaja en este caso (9-11).

En el análisis de muestras de miel, debido a la complejidad de la matriz y a que es necesario realizar exhaustivos procesos de limpieza, se han reportado diversos métodos, entre ellos el QuEChERS modificado (12). Aunque este método resulta ser una excelente alternativa cuando se dispone de analizadores de masas en tándem, al emplear detectores convencionales como fluorescencia, nitrógeno-fósforo, captura de electrones o inclusive un espectrometrómetro de masas con un cuadrupolo sencillo, la cantidad de interferentes limita el uso del método en un número elevado de compuestos o impide la obtención de límites de cuantificación acordes con la legislación (13, 14).

En este sentido, este trabajo tuvo como objetivo desarrollar un método para la determinación de 56 plaguicidas de diferentes familias químicas en muestras de miel, mediante el empleo de UFLC (cromatógrafo líquido ultra rápido por sus siglas en inglés) acoplado a un analizador de masas de cuadrupolo simple. De igual modo, se buscó demostrar la aptitud del método mediante una validación de nivel 2 (15).

## Materiales y métodos

### Materiales, reactivos y soluciones

Se trabajó con estándares de plaguicidas de pureza mayor al 95%, provenientes de las casas comerciales Dr Ehrenstorfer y Chemservice. Las soluciones madre fueron preparadas en concentraciones cercanas a 500 µg/mL en acetónitrilo o metanol y almacenadas en frascos ámbar a -20 °C. Los solventes empleados en este estudio fueron J.T. Baker grado HPLC. Para los ensayos de extracción se utilizaron sales de QuEChERS Restek Q-Sep TM y para la limpieza de los extractos se emplearon los adsorbentes Restek dSPE Q-Sep TM. Los detalles de preparación mezclas y del estándar interno se encuentran en trabajos previos (16, 17).

### Mieles de partida

Se emplearon cuatro mieles obtenidas de apiarios experimentales y mieles comerciales provenientes del altiplano cundiboyacense y del departamento del Meta en Colombia. Todo el material fue analizado antes y durante todo el proceso de desarrollo del método analítico, con el propósito de asegurar que no se tuviera presencia de ninguno de los plaguicidas estudiados, así como de controlar los procesos de contaminación cruzada.

### Método de extracción de partida

Se partió del método QuEChERS para mieles (18). En un tubo de centrifuga se pesaron 5 g de muestra, se adicionó TPP (fosfato de trifenilo) y la mezcla de plaguicidas (concentraciones entre 0,1 y 5 µg/mL). Se dejó en reposo por 15 min y, transcurrido ese tiempo, se adicionaron 10 mL de agua y 10 mL de acetónitrilo; se agitó de manera manual por 1 min y, posteriormente, se adicionaron 4 g de MgSO<sub>4</sub> anhidro y 1 g de AcONa; nuevamente se agitó manualmente por 1 min. Después, se centrifugó a 6000 rpm por 5 min y se tomaron 10 mL del sobrenadante, que se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 mL.

Para el proceso de limpieza, por cada mililitro de extracto se adicionaron 25 mg de amina primaria/secundaria (PSA, por sus siglas en inglés) y 150 mg de  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se agitó manualmente por 30 s y se centrifugó por 2 min a 6000 rpm. Se tomaron 5 mL de extracto y se concentraron con un flujo de nitrógeno hasta llevar a casi sequedad, posteriormente se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  del EI y se reconstituyó con 1 mL de una mezcla Agua-ACN (7:3). Finalmente, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de PTFE y se transfirió a un vial de cromatografía (19). Durante el desarrollo del método, en todos los experimentos se realizó un mínimo de cinco réplicas.

### Estudio de los adsorbentes

Una vez establecidas las mejores condiciones en la etapa de extracción de los compuestos, con el propósito de mejorar la selectividad del método, se procedió a estudiar el empleo de diferentes adsorbentes para la limpieza de los extractos. De acuerdo a la composición química de las mieles, se considera que los principales compuestos que interfieren en el proceso de detección de los plaguicidas pueden ser vitaminas, fenoles, pigmentos, aminoácidos, ácidos orgánicos e inclusive azúcares (28). La reducción de la presencia de ácidos, aminoácidos y azúcares, como se mencionó en la sección experimental, se realizó a través del empleo de PSA y sulfato de magnesio. De esta manera, para mejorar el proceso de limpieza se adicionaron otros adsorbentes: octadecilsilano (C18; 20 mg por cada mL de extracto) y carbón negro grafitizado (CNG; 20 mg por cada mL).

### Calibración analítica y análisis de datos

Se realizó un proceso de evaluación de efecto matriz previo a la cuantificación de cada analito. Se encontraron porcentajes de efecto matriz entre 69% y 130%, resultados que concuerdan con estudios previos (17, 20). Por lo anterior se realizaron también diferentes niveles de calibración en blancos de matriz. Para el caso de los ensayos de recuperación, se cuantificó con un solo punto de calibración, de acuerdo a las recomendaciones del documento SANTE (20). Para la evaluación de la linealidad del sistema, se preparon las curvas de calibración que estaban compuestas por seis puntos de calibración en blanco de matriz, cada uno de ellos se inyectó cuatro veces en el sistema analítico; los puntos se distribuyeron equidistantemente. Todos los análisis estadísticos se realizaron a través del paquete estadístico R Commander a un nivel de confianza del 95% (22).

### Validación del sistema de medición.

Con el fin de demostrar que el sistema de medición funcionaba adecuadamente, se realizó una validación de nivel 2, consistente en evaluar: selectividad, exactitud, linealidad, límites de detección y límites de cuantificación.

Por otro lado, para la evaluación de la exactitud del método, como recuperación y precisión en condiciones de repetibilidad y de precisión intermedia, se fortificaron muestras de miel a tres niveles de concentración. El primer nivel (LC) correspondía al límite máximo de residuos, una concentración inferior a este o en su defecto concentraciones cercanas a 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . El segundo y tercer nivel de fortificación correspondieron a 2 y 5 veces el primer nivel (LC).

### Instrumentos y equipos

#### Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico fue llevado a cabo en un UFLC Shimadzu Prominence (Maryland, CA, EUA), acoplado a un detector selectivo de masas LCMS-2020. Los análisis fueron llevados a cabo en una columna Shim Pack (6 cm  $\times$  2 mm d.i., tamaño de partícula de 2,1  $\mu\text{m}$  y fase estacionaria C18); se trabajó en modo de gradiente con ácido fórmico al 0,1% (*p/v*) y acetato de amonio 5 mM en agua Milli-Q (A); la fase orgánica empleada fue acetonitrilo (B). El programa de elución utilizado, expresado como porcentaje de B, inicia a 0% (0 min) aumenta a 20% en 0,01 min, se mantiene por 0,3 min, posteriormente llega hasta 55% en 8,5 min y luego aumenta hasta el 100% en los siguientes 1,5 min. Finalmente, se mantiene por 1,5 min (17). El volumen de inyección fue 5  $\mu\text{L}$ , la temperatura de columna 40 °C y el flujo de fase móvil 0,3 mL/min.

#### Condiciones de la interfaz y espectrómetro de masas

Con el propósito de obtener una mejor sensibilidad para la identificación y cuantificación de los 56 plaguicidas en estudio, se trabajó con dos métodos de adquisición independientes: un estándar interno (TBP) y un estándar subrogado (TPP) Aunque las condiciones cromatográficas fueron las mismas, las condiciones de la interfaz y del espectrómetro variaron. En este sentido, el equipo operó en modo electrospray, con un flujo de gas de secado de 10 L/min y un flujo de gas nebulizador de 1,5 L/min; las temperaturas del bloque de calentamiento y de la línea de eliminación del solvente correspondieron a 200 °C y 250 °C y a 210 °C y 250 °C para el primer (Grupo 1 de compuestos) y segundo método de adquisición (Grupo 2 de compuestos), respectivamente (16, 17).

Los análisis fueron llevados de manera simultánea en modo positivo y negativo, el voltaje aplicado en el capilar correspondió a 4500 V y -4500 V respectivamente. Todos los análisis fueron realizados en modo SIM. La Tabla 1 muestra los iones seleccionados para la cuantificación y el tiempo de retención de cada compuesto: las tres primeras columnas muestran las condiciones para el método de adquisición 1, mientras que las tres últimas columnas son para el método de adquisición 2. Estos compuestos fueron seleccionados acorde con la legislación nacional e internacional (23), el nivel de afectación a las abejas, su uso en Colombia, sensibilidad en el instrumento y la disponibilidad del material de referencia para la calibración del instrumento.

**Tabla 1.** Iones de cuantificación (T) para los compuestos estudiados y tiempos de retención para los dos métodos de adquisición empleados

MÉTODO 1			MÉTODO 2		
Compuesto	t <sub>retención</sub> (min)	Ion T (m/z)	Compuesto	t <sub>retención</sub> (min)	Ion T (m/z)
Acefato	2,56	201	Metamidofos	2,54	142
Monocrotofos	2,78	241	propamocarb	2,63	189
Oxamil	2,91	237	Tiociclam	2,68	182
Metomil	3,06	163	Linuron	2,70	-247
Carbendazim	3,15	192	Nitenpiram	2,79	271
Imidacloprid	3,52	-254	thiametoxan	2,99	292
Dimetoato	3,63	230	dazomet	3,03	163
Tiabendazol	3,24	202	mevinphos	3,17	225
Cimoxanil	3,86	-197	3-OH carbofuran	3,17	255
Tiodicarb	4,83	355	Acetamiprid	3,30	223
Carbofuran	4,81	222	Tiacloprid	3,71	-297
Atrazina	5,19	216	Dinotefuran	2,70	203
Metalaxyl	5,34	280	Simazina	4,08	202
Pirimicarb	4,81	239	Carbaryl	4,57	219
Imazalil	4,66	297	Isoprocarb	5,90	235
3,4-dicloropropilanolida	5,89	-216	Ametrina	6,17	269
Pirimetanil	6,03	200	Tridemoprh	6,62	298
Dimetomorf	5,93	390	Epoxiconazole	6,70	330
Azoxistrobin	6,49	404	Fenexhamid	7,81	-300
Tebuconazol	6,79	308	Etoprofos	7,81	284
Metoxyfenozida	6,86	369	Flusilazole	7,94	357
Hexaconazol	7,00	-358	Penconazol	8,07	325
Espinosad A	6,33	733	Piraclostrobin	9,80	388
Benalaxil	7,73	326	Trifloxistribina	9,17	409
Difenoconazol	7,69	408	Lufenuron	9,41	-509
Azinfos Metil	7,78	368	Buprofezin	9,91	306
Espinosad D	6,49	747	Clorfenaprid	7,74	-349
Indoxacarb	8,27	528	Temefos	9,66	467

NOTA: los signos negativos en los iones representan que se realizó la detección en modo negativo

## Resultados y discusión

### Estudio de la relación cantidad de muestra/solvente de extracción

Con el propósito de obtener límites de cuantificación acordes con la legislación existente para mieles (23), se partió del método europeo (citratos) y se realizaron ensayos en los que se incrementó la cantidad de muestra desde 3 g hasta 10 g y otros en los que se disminuyó la cantidad de solvente de 10 mL a 5 mL.

Se encontró que los porcentajes de recuperación de varios compuestos como el metalaxil, acefato, oxamilo, entre otros, disminuyeron notablemente. Asimismo, la cantidad de interferencias que se obtuvieron al incrementar la relación muestra/solvente de extracción impidió la detección adecuada de varios compuestos. En este sentido, como parte del desarrollo del método y en vista de los resultados obtenidos en esta primera etapa se decidió trabajar con 5 g de muestra y 10 mL de solvente orgánico e incluir una etapa de concentración de la muestra.

## Selección del sistema de amortiguación de pH

Debido a que el método QuEChERS presenta dos versiones, reconocidas como métodos oficiales para el análisis de residuos de plaguicidas, se evaluaron las dos con el propósito de determinar cuál es la más adecuada. La primera corresponde al método AOAC 2007.01 (19) (Método A), en la que se usa acetato de sodio para realizar el control de pH en el proceso de extracción. La segunda versión del método considera el uso de sales de citrato y corresponde a la versión europea del método EN 15662 (26), (método B).

Los resultados mostraron que, mediante el método A, 14 compuestos presentaron interferencias que impidieron realizar la integración de las señales cromatográficas; para el método B se presentaron 13 interferencias. Lo anterior supone que, debido a una baja selectividad de los métodos, no es posible la cuantificación de cerca del 24% de los compuestos bajo estudio. La Figura 1 muestra los compuestos que presentaron interferencias y una recuperación inferior al 70% en al menos uno de los métodos. Por otro lado, los compuestos restantes presentaron recuperaciones entre el 70% y el 120%, recuperación que se considera aceptable para este tipo de determinaciones (21).

Se realizó un análisis de varianza con el propósito de evaluar si existen diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) entre las medias de los porcentajes de recuperación. Los resultados no fueron del todo concluyentes, pues para la mayoría de los casos no se presentaron diferencias significativas entre los sistemas evaluados. Sin embargo, al comparar con los criterios de la Unión Europea, se encuentra que sí se observan diferencias, por ejemplo, para dinotefuran se encontró una probabilidad de aceptar  $H_0$  mayor a 0,05. No hay diferencias significativas, pero en la Figura 1 se encuentra que, con el método B, este compuesto cumple con lo establecido por la Unión Europea. Por este motivo, los análisis estadísticos se omitieron en este estudio y todos los resultados y discusión se centran en lo establecido en los criterios de la Unión Europea para este tipo de métodos analíticos.

Como se observa en la Figura 1, existen casos críticos en los que la recuperación se encuentra por debajo del 50%, por ejemplo espinosad (A y D) y carbendazim; los demás compuestos presentan valores de recuperación muy cercanos al 70 %. Por otro lado, en la evaluación de las precisiones de cada uno de los métodos, se encontró que mediante el método A, se presentaron coeficientes de variación superiores al 15% en 11 casos, mientras que para el método B se encontraron 8 casos.

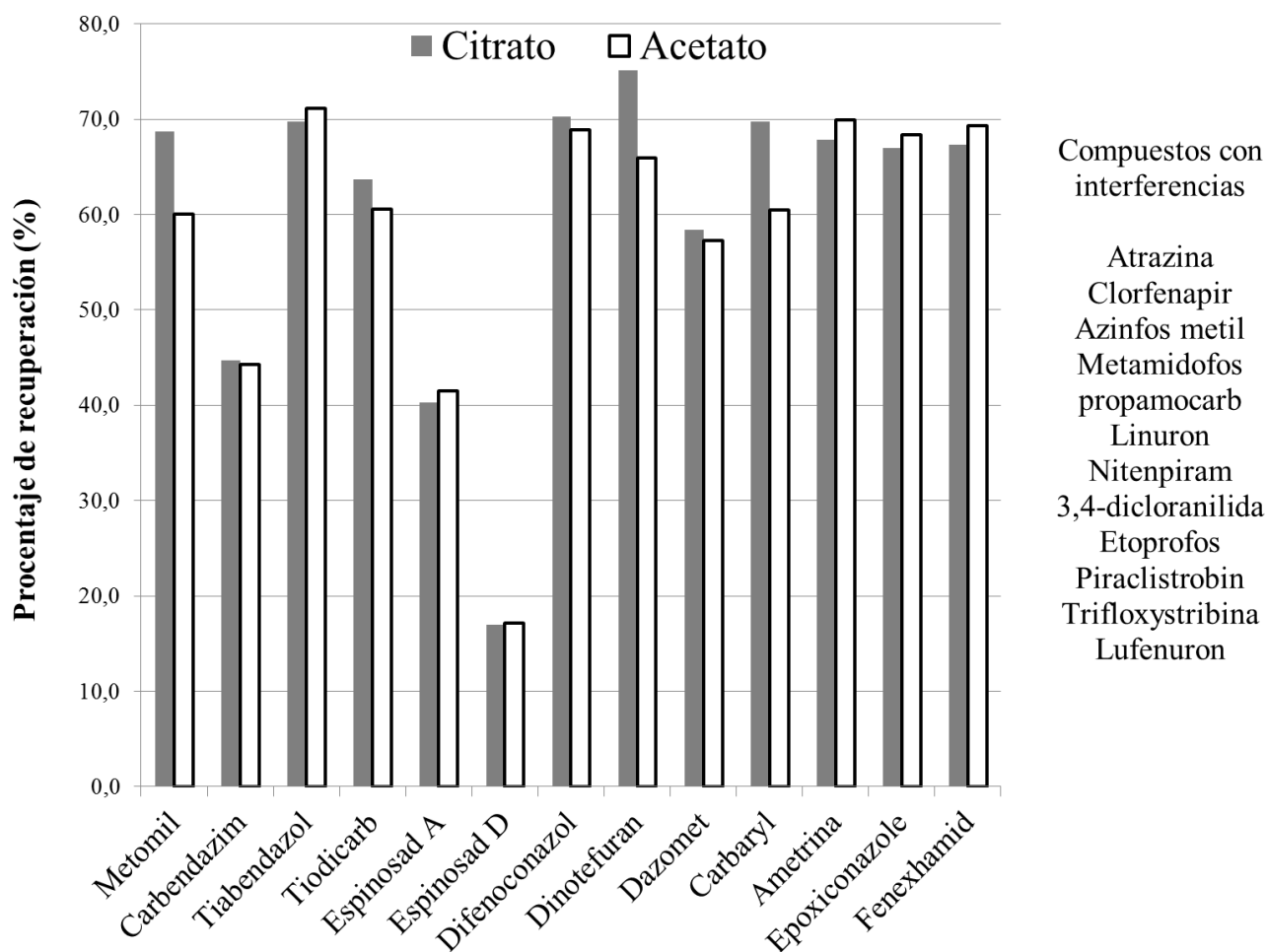


Figura 1. Comparación de los porcentajes de recuperación al emplear acetato o citrato como sal de control de pH

El método B mostró una mejor exactitud, reflejada en mejor selectividad, mayor número de compuestos con recuperación aceptable y menor dispersión en los resultados.

Los resultados indicaron que, para el caso de los plaguicidas estudiados y la matriz de interés, resulta más conveniente realizar la extracción con las sales de citrato, es decir empleando el método B. Sin embargo, es de resaltar que la versión europea del método, además de las sales de citrato, incluye NaCl, lo cual incrementa la fuerza iónica y, por consiguiente, mejora la transferencia de los analitos a la fase orgánica. Por lo anterior, se decidió trabajar con este sistema amortiguador de pH.

### Adición de las sales

El método original indica que las sales de citrato, el NaCl y el  $\text{MgSO}_4$ , se adicionan una vez se agrega el agua a la miel y se homogeniza esta mezcla. Durante este proceso, se observó que las sales se aglomeraban y su dispersión a través de la mezcla de extracción (miel-agua-acetonitrilo) no era sencilla de realizar. Adicionalmente, hubo un calentamiento significativo, debido a la hidratación del  $\text{MgSO}_4$ , por lo cual se decidió disolver las sales de citrato y NaCl para realizar su adición junto con el agua. Entonces, en lugar de adicionar sólo agua para el proceso de homogenización de la sal, se adicionaron 10 mL de una solución amortiguadora de citratos (pH = 6,8), la cual tenía la cantidad de sales equivalente al método QuEChERS, a excepción del  $\text{MgSO}_4$ .

Posterior a esta adición, se realizó una homogenización de la mezcla, se adicionó el acetonitrilo y se realizó la extracción con agitación por 10 min en un vórtex, luego se destapó el tubo y se realizó la adición del  $\text{MgSO}_4$ ; se agitó manualmente. Algunos de los resultados obtenidos a través de estas modificaciones se presentan en la Figura 2. Se encontró que las modificaciones realizadas al método mejoran los resultados en la exactitud del método de manera notable.

La Figura 2 muestra que, para 8 de los 12 compuestos que no se recuperaron con el método tradicional, se obtuvieron porcentajes superiores al 70%, lo cual indica que el sesgo del método disminuyó. Sin embargo, de acuerdo a estos resultados, carbendazim, tiodicarb, dazomet y espinosad (A y D) siguen presentando porcentajes de recuperación bajos.

La mejora en la recuperación se atribuye a varios factores: por un lado, el proceso de extracción se realizó sin la presencia del  $\text{MgSO}_4$  en la mezcla de la miel, puesto que este se adiciona hasta el final de este proceso; adicionalmente, al realizar la extracción con solo la disolución amortiguadora y el acetonitrilo, se obtiene un sistema más homogéneo (no hay aglomeraciones) y no se dan procesos de calentamiento por la adición del  $\text{MgSO}_4$  en el momento de la extracción. Por otro lado, posiblemente se tenga un mejor control del pH al adicionar la disolución amortiguadora, de lo contrario, solo hasta que se disolviera la totalidad de las sales de citrato en la mezcla, se lograría el control del pH debido a la viscosidad de la miel.

Sumado a lo anterior, cuando se realiza la adición del  $\text{MgSO}_4$  a la mezcla (al final de la extracción), el calor liberado parece disiparse más rápidamente pues, si bien se forma la aglomeración del método original, esta es más fácil y rápida de disolver a través de la agitación manual. Se cree que el uso del vórtex también contribuye al aumento de los porcentajes de recuperación pues facilita la transferencia de masa del analito hacia la fase orgánica y se aplica durante un mayor tiempo, lo que garantiza que exista un equilibrio mayor. Finalmente, las modificaciones realizadas al método no redujeron la cantidad de compuestos con interferencias, es decir, con este método se obtuvo el mismo número de compuestos que no se pudieron determinar debido a problemas de selectividad. Incluso, en los perfiles cromatográficos obtenidos para los blancos con el uso de este método, se observó una mayor cantidad de ruido en comparación con el método original. Lo anterior es atribuido a las modificaciones realizadas, pues junto con los analitos existe una mayor cantidad de compuestos de la matriz que se coextraen.

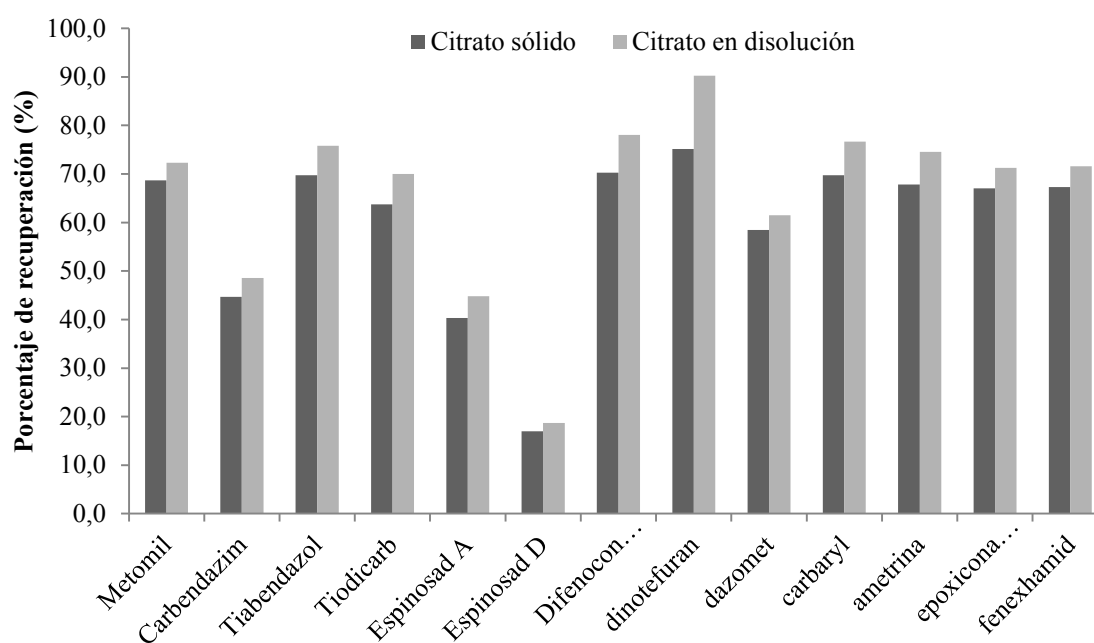


Figura 2. Comparación del modo de adición de las sales de citrato para el control del pH en la extracción de plaguicidas en miel

## pH de disolución amortiguadora

En diferentes trabajos se encuentran estudios relacionados con la influencia del pH sobre la recuperación de algunos compuestos (26, 27). Sin embargo, en todos los estudios se menciona el término *pH aparente*, pues esta magnitud es medida en acetonitrilo y no en una solución acuosa. En este sentido y acorde con la instrumentación y materiales de referencia con los que se cuenta para la calibración de los instrumentos de pH, se optó por evaluar la influencia del pH de la disolución de amortiguación sobre la exactitud de los analitos. Para ello se ajustaron las disoluciones con ácido fórmico a 4 diferentes valores de pH; la Figura 3 muestra un resumen de los resultados obtenidos. Allí se presenta el promedio de recuperación de todos los compuestos, el número de compuestos que tienen porcentajes de recuperación inferiores a 70% y el número de compuestos para los que el método no es preciso, es decir, porcentajes de coeficiente de variación superiores al 15%.

La Figura 3 muestra que al comparar los tres valores más altos de pH, se encuentra que estos no varían de manera considerable, igual que el número de compuestos con recuperaciones bajas o dispersiones altas. Sin embargo, para los dos valores de pH más bajos se observa que, tanto la recuperación como la precisión del método, es incrementada, pues tienen solo 6 y 2 compuestos con % CV mayores al 15%; para el valor de pH más bajo se tienen solo 3 compuestos con recuperaciones inferiores al 70%.

El incremento de la precisión y de la recuperación de los compuestos a pH bajos, se atribuye a una mayor estabilidad de los compuestos a estos valores de pH (25). En diferentes reportes se encuentra que el valor de “pH aparente” (en acetonitrilo), donde la extracción de los plaguicidas fue más eficiente, se encuentra entre 5,5 y 5,8. Esto indica que, posiblemente, el resultado de la mezcla de la miel con las disoluciones amortiguadoras de valores de pH más bajos (5 y 5,5) proporcionan valores de pH en el sistema de extracción (miel + disolución) similar a este valor de pH aparente, reportado en otros estudios (19).

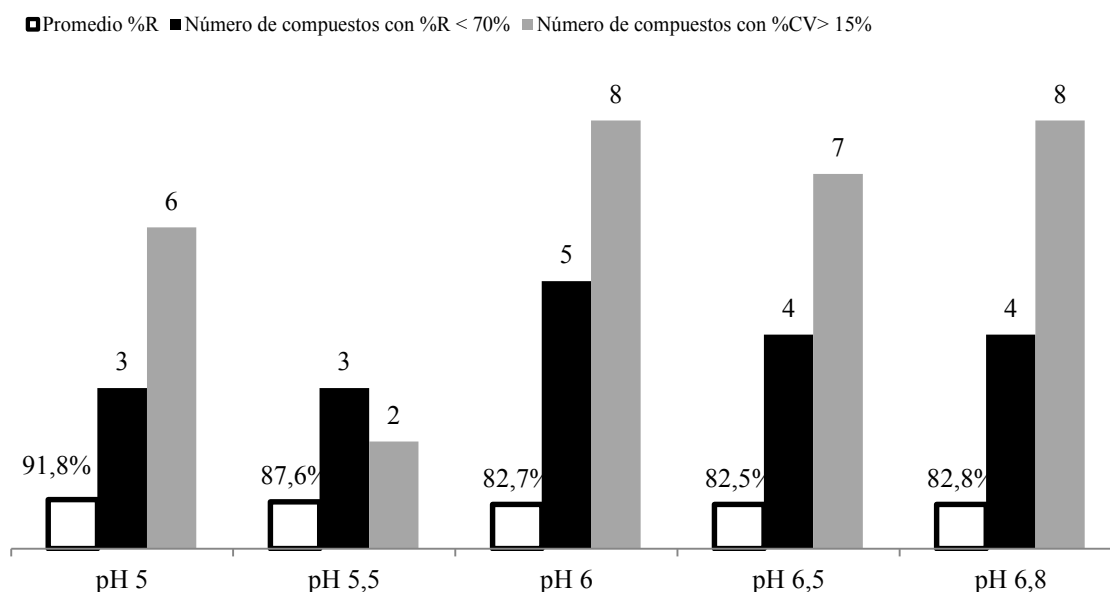
La estabilidad de los compuestos no solo puede originar errores sistemáticos (como menores porcentajes de recuperación), sino también puede originar errores aleatorios: pequeños cambios en otras magnitudes de influencia como la temperatura o el tiempo de extracción suponen un aumento de estos errores. En este sentido, el mejor promedio en los porcentajes de recuperación de los compuestos se logra con el pH más bajo, valor al que la mayoría de los compuestos presentan los menores errores sistemáticos.

Sin embargo, en este valor de pH, cualquier mínimo cambio en otra variable de influencia genera un aumento en los errores aleatorios, por lo cual se presentan mayores coeficientes de variación que para el valor de pH de 5,5. De esta manera, al realizar la extracción a un pH de 5,5 se tiene un punto de equilibrio entre el control del error sistemático y el error aleatorio, pues, como se puede observar en la Figura 3, es donde se tiene una mejor exactitud. Por lo tanto, a partir de este ensayo se concluye que, dentro de los valores de pH evaluados, la mejor condición corresponde a 5,5.

Finalmente, los compuestos que presentaron porcentajes de recuperación menores al 70% a pH 5 correspondieron a los isómeros del espinosad y carbendazim. Para el caso de los primeros no fue posible encontrar los valores de pKa, por lo cual se cree que estos compuestos sufren algún tipo de hidrólisis o descomposición que impide una adecuada extracción. Para el caso del carbendazim, el pKa es 4,48, por tanto, es posible que al encontrarse la molécula ionizada la extracción por parte de un solvente orgánico no sea eficiente (19).

## Adsorbentes de limpieza

La Tabla 2 muestra un resumen de los resultados obtenidos a través del uso de diferentes sistemas de limpieza. Es de aclarar que para este estudio se partió de blancos de miel, se obtuvieron extractos libres de plaguicidas, se mezclaron y fueron fortificados antes del proceso de limpieza, lo cual buscaba reducir la variación producida por el proceso de extracción (29).



**Figura 3.** Porcentajes de recuperación promedio (%R), número de compuestos con %R inferiores a 70% y con coeficientes de variación (%CV) mayores al 15% para los diferentes valores de pH evaluados

**Tabla 2.** Porcentajes de recuperación obtenidos en la evaluación de diferentes sistemas de limpieza

Nombre del compuesto	Promedio % de recuperación			
	PSA	PSA + CNG	PSA + C18	PSA + C18 + CNG
Metamidofos	I	I	87,6	80,2
Propamocarb	I	I	93,5	90,2
Linuron	I	I	100,9	96,8
Nitempiram	I	I	100,3	95,3
3,4-dicloropropinalidina	I	I	97,3	99,2
Etoprofos	I	I	98,2	90,2
Piraclostrobin	I	94,4	97,4	92,3
Trifloxtribina	I	I	100,3	98,3
Lufenuron	I	94,0	103,4	92,7
Tiociclam	I	I	I	I
Atrazina	I	I	100,1	91,2
Clorfenapyrid	I	I	96,8	92,9
Azinfos metil	I	I	I	I

I: Compuesto con interferencia que no permitió determinar el porcentaje de recuperación

La Tabla 2 evidencia que el empleo de otro tipo de adsorbentes mejora la selectividad de los compuestos, pues se observa un descenso en el número de compuestos con interferentes, respecto a la limpieza únicamente con PSA para cualquiera de los sistemas evaluados. También se observa que la mejor alternativa para la limpieza de los extractos es el C18, pues mejoró la selectividad para casi la totalidad de los compuestos en los dos conjuntos de ensayos en los que se usó.

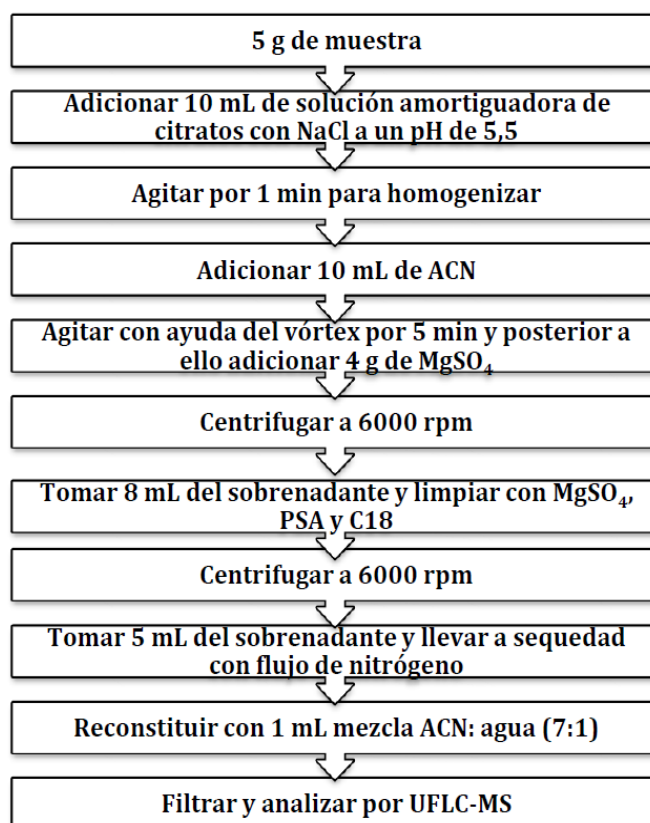
Para el caso de tiociclam y de metil azinfos, no se pudo mejorar la selectividad del método, a pesar de que se realizaron algunos experimentos adicionales en los que se aumentó la cantidad de adsorbentes usados; en su lugar se obtuvieron porcentajes de recuperación menores para algunos compuestos.

Para el caso específico del Tiociclam, debido a su naturaleza polar (ver tiempos de retención en la Tabla 1), se cree que es necesario realizar otro tipo de limpieza como cromatografía de intercambio iónico, de columna en fase normal o la adición de otro adsorbente más polar como la sílica, pues el interferente debe ser de la misma naturaleza. Para el caso del metil azinfos se considera que la interferencia de origen tiene una estructura muy similar a este compuesto.

Por otra parte, se encuentra que el uso de CNG no contribuye de manera significativa a la mejora de la selectividad del método, pues los resultados indican que permite la reducción de interferentes para sólo tres compuestos. Asimismo, al observar el último sistema que incluye C18 y PSA, se encuentra que el carbón no aporta de manera significativa, al contrario, para algunos compuestos los porcentajes de recuperación son inferiores, lo cual se debe posiblemente a la adsorción de los analitos generada por la mayor área superficial que se tiene.

El acetonitrilo es un solvente conocido por no extraer demasiados compuestos de naturaleza lipídica así como compuestos de elevada polaridad como el caso de los azúcares.

Sin embargo, el aumento de la fuerza iónica en el sistema de extracción a través del  $\text{MgSO}_4$  y del  $\text{NaCl}$ , inducen a que se extraigan este tipo de compuestos junto con los analitos. En este sentido, se considera que el empleo de C18 reduce notablemente la cantidad de interferentes, debido a la adsorción de este tipo de compuestos que tienen baja solubilidad en acetonitrilo. Adicionalmente, es posible que exista un efecto sinérgico al hacer uso de PSA y C18, pues las señales producidas por los interferentes químicos se redujeron a lo largo de todo el cromatograma. Finalmente, la Figura 4 describe el esquema general del método desarrollado.

**Figura 4.** Esquema general del método desarrollado para el análisis de residuos de plaguicidas en miel a través de UFLC-MS

### Validación del sistema de medición

La selectividad del método se evaluó a través del uso de cuatro diferentes tipos de miel, los cuales se diferenciaban por su origen. Los resultados obtenidos en esta evaluación mostraron resultados idénticos a los reportados en la Tabla 2 (sistema PSA + C18), es decir, el método es selectivo para todos los analitos de interés excepto para metil azinfos y tiociclam.

En las Tablas 3 y 4 se presentan las concentraciones de fortificación, los resultados de exactitud y los límites de detección del método. Los límites de detección reportados, fueron estimados a partir de diferentes aproximaciones (30) y para todos los casos en el proceso de confirmación se encontró que la relación señal/ruido era superior a 3.

**Tabla 3.** Resultados obtenidos en la validación del método desarrollado. Grupo de compuestos 1- Método de adquisición 1

Compuesto	Concentración de fortificación más baja (µg/kg)	%Recuperación al LC	%Recuperación a 5 x LC	%Recuperación del método *	%CV máximo en condiciones de precisión intermedia	LD (µg/kg)
Acefato	13,17	85,1	87,3	86,2	15,52	4,93
Oxamilo	9,96	91,6	88,0	80-103,8**	10,41	4,24
Monocrotofos	9,78	103,2	90,5	80,4-111	11,58	4,12
Metomil	10,07	87,2	78,6	82,9	6,48	2,81
Carbendazim	8,21	49,8	47,1	18,8-70,1	17,55	ND
Tiabendazol	12,55	94,5	84,2	72,3-97,9	12,28	6,12
3OH-carbofuran	11,34	98,7	88,0	85-105,2	7,36	3,19
Dimetoato	10,70	97,1	83,2	90,2	8,09	1,36
Cimoxanil	79,75	92,5	88,4	90,4	11,29	23,58
Carbofuran	8,92	97,3	95,9	96,6	9,62	2,51
Tiodicarb	8,32	86,5	83,2	84,9	16,18	2,23
Pirimicarb	5,87	93,2	83,0	72,8-94,9	14,02	2,05
Atrazina	5,95	93,9	91,0	92,5	11,84	1,19
Metalaxilo	5,94	99,0	96,9	98	10,16	1,15
Imazalil	8,21	94,0	83,7	73,8-100,7	6,95	2,19
Dimetomorf	13,13	100,9	102,3	101,6	11,60	5,66
Pirimetanil	8,70	91,0	78,5	84,8	11,43	3,83
Azosxitrobina	6,01	102,1	104,5	103,3	10,08	1,63
Espinosad A	14,69	51,7	49,6	32,4-58,5	6,52	ND
Tebuconazol	15,95	93,5	93,7	81,9-102,5	12,80	1,98
Metoxifenoazida	13,24	100,6	100,1	93,2-104,5	8,54	2,51
Hexaconazol	10,93	95,0	99,3	87,1-108,4	13,03	2,85
Espinosad D	14,69	37,1	39,7	38,4	6,91	ND
Difenoconazol	88,36	90,5	88,6	75,4-102,4	7,80	14,63
Benalaxilo	6,47	97,1	97,3	97,2	10,86	1,37
Clorfenapir	198,94	95,0	87,5	72,8-98	13,62	61,20
azinfos metil	6,99	281,1	411,9	80,9-1033,4	81,99	ND
Indoxacarb	28,75	91,9	95,7	82,1-99	8,36	6,15

\*Estimado a partir de los resultados de precisión intermedia. Para los casos en los que se presentó heterocedasticidad entre las diferentes concentraciones evaluadas se presenta el intervalo de porcentajes de recuperación.

ND: No determinado para este compuesto.

**Tabla 3.** Resultados obtenidos en la validación del método desarrollado. Grupo de compuestos 2- Método de adquisición 2

Compuesto	Concentración de fortificación más baja (µg/kg)	%Recuperación al LC	%Recuperación a 5 x LC	%Recuperación del método*	%CV máximo en condiciones de precisión intermedia	LD (µg/kg)
Metamidofos	41,70	88,9	96,5	92,7	13,85	6,15
Propamocarb	12,48	92,4	103,3	97,9	15,53	4,20
Dinotefuran	10,99	89,5	88,7	80-106,6	15,09	3,17
Linuron	18,96	91,8	85,1	73,6-99,5	15,12	7,20
Nitenpiram	13,46	85,6	102,9	94,3	12,94	2,95
Thiametoxan	16,67	97,3	97,3	97,3	4,43	4,75
Dazomet	52,03	84,4	83,9	70,1-111	14,85	18,02
Mevinphos	16,97	92,5	87,8	73,5-111	11,64	7,77
Imidacloprid	169,95	93,8	105,8	99,8	16,54	57,03
Acetamiprid	66,45	102,9	95,9	88,7-105,8	12,12	11,13
Tiacloprid	16,71	111,0	110,4	110,7	9,15	2,65
Simazina	5,87	98,5	97,3	97,9	12,02	0,85
Carbaryl	38,95	96,2	103,9	87,6-112,9	9,32	7,13
Isoprocarb	44,11	93,7	86,2	90	14,95	9,53
Ametrina	13,26	91,6	98,1	94,9	9,35	1,36
3,4-dicloranilida	9,03	92,6	104,7	77,5-115,8	10,35	0,95
Tridemoprh	74,91	99,7	79,9	74,5-101,2	19,46	17,17
Epoxiconazole	85,22	97,4	105,8	81,1-119,1	14,30	24,26
Fenexhamid	41,48	78,4	94,9	86,7	13,20	9,32
Etoprofos	30,08	86,8	91,3	89,1	12,28	8,70
Flusilazole	14,88	99,7	111,1	96,8-115,3	7,52	4,92
Penconazol	12,42	94,6	110,5	102,6	11,09	2,41
Piraclostrobin	11,31	38,6	21,9	12,9-68,6	21,14	ND
Trifloxystribina	8,46	89,3	102,8	81,3-113,5	10,27	1,46
Lufenuron	8,57	31,5	32,7	32,1	34,59	ND
Benfuracarb	7,76	100,9	102,2	84,1-111,9	13,77	2,28
Temefos	65,46	88,8	94,7	75,2-112,8	16,98	29,00
Buprofezin	11,44	79,2	94,0	86,6	14,30	4,71

\*Estimado a partir de los resultados de precisión intermedia. Para los casos en los que se presentó heterocedasticidad entre las diferentes concentraciones evaluadas se presenta el intervalo de porcentajes de recuperación.

ND: No determinado para este compuesto.

Las Tablas 3 y 4 muestran que para la mayoría de los compuestos se presentaron porcentajes de recuperación entre el 70% y 120%, por lo cual se puede concluir que el método presenta un error sistemático aceptable, a excepción de carbendazim, espinosad (A y D), lufenuron y piraclostrobina, cuyos porcentajes de recuperación fueron inferiores al 70%.

Por otro lado, se encontró que el máximo %CV para cada uno de los analitos, en general, es inferior al 15%, lo cual cumple con el criterio de la Unión Europea (21). Sin embargo, para algunos compuestos se observa que este %CV supera el 15%, pero debe tenerse en cuenta que el criterio de la Unión Europea se establece para compuestos en condiciones de repetibilidad, y que el %CV presentado en las Tablas 3 y 4 se obtiene para condiciones de precisión intermedia (interanalistas). Por lo tanto, se considera que para todos los casos el método es preciso, a excepción de los casos en los que el método no es selectivo (tiociclam y metil azinfos) o presenta una recuperación inadecuada (menor al 70%).

La evaluación de la linealidad del sistema de medición se realizó a través de diferentes pruebas como: ANOVA, falta de ajuste, significancia de la pendiente y del intercepto, entre otras (16). Todos los resultados indicaron que el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones presentadas en la Tabla 5.

## Conclusiones

Se logró desarrollar y validar un método para el análisis de residuos de plaguicidas en mieles, basado en una extracción líquido-líquido con acetonitrilo y posterior limpieza a través de extracción en fase sólida dispersiva. En el proceso de desarrollo del método, se encontró que la homogenización de la miel con una solución amortiguadora a un pH de 5,5 incrementa la exactitud del método.

**Tabla 5.** Intervalo lineal del método analítico

Compuesto	Intervalo lineal (ng/mL)	Compuesto	Intervalo lineal (ng/mL)
Acefato	18,8-188,2	Metamidofos	59,6-595,7
Oxamil	14,2-142,3	Propamocarb	17,8-178,2
Monocrotofos	14-139,7	Dinotefuran	15,7-157
Metomil	14,4-143,9	Linuron	27,1-270,8
Carbendazim	11,7-117,2	Nitenpiram	19,2-192,2
Tiabendazol	17,9-179,3	Thiametoxan	23,8-238,1
3OH-carbofuran	16,2-161,9	Dazomet	74,3-743,2
Dimetoato	15,3-152,9	Mevinphos	24,2-242,4
Cymoxanil	113,9-1139,3	Imidacloprid	242,8-2427,8
Carbofuran	12,7-127,4	Acetamiprid	94,9-949,3
Thiodicarb	11,9-118,8	Tiacloprid	23,9-238,8
Pirimicarb	8,4-83,9	Simazina	8,4-83,8
Atrazina	8,5-84,9	Carbaril	55,6-556,4
Metalaxil	8,5-84,9	Isopocarb	63-630,1
Imazalil	11,7-117,2	Ametrina	18,9-189,5
Dimetomorf	18,8-187,6	3,4-dicloropropinalidina	12,9-129
Pirimetanil	12,4-124,3	Tridemorph	107-1070,1
Azoxistrobin	8,6-85,8	Epoxiconazole	121,7-1217,5
Spinosad	21-209,8	Fenexamid	59,3-592,6
Tebuconazol	22,8-227,8	Etoprofos	43-429,7
Metoxifenozida	18,9-189,2	Flusilazole	21,3-212,6
Hexaconazol	15,6-156,1	Penconazol	17,7-177,4
Spinosad	21-209,8	Piraclostrobin	16,2-161,5
Difenoconazol	126,2-1262,2	Trifloxystrobin	12,1-120,8
Benalaxil	9,2-92,4	Lufenuron	12,2-122,4
Clorfenapyrid	284,2-2841,9	Befurcarb	11,1-110,9
Azinfos metil	10-99,8	Temefos	93,5-935,1
Indoxacarb	41,1-410,7	Buprofezin	16,3-163,4

Por otro lado, la selectividad del método mejoró notablemente al realizar uso de una mezcla de octadecilsilano (C18) y sílica funcionalizada con aminas (PSA). Por su parte, el proceso de validación indicó que el método es selectivo, preciso, lineal y exacto para 50 de los 56 plaguicidas empleados. Finalmente, se encontró que el método no es selectivo para 2 de los compuestos estudiados y no es exacto para 4.

## Agradecimientos

Expresamos nuestros agradecimientos al Centro de Bio-Sistemas y a la Dirección de Investigación, Creatividad e Innovación de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano por su apoyo y financiación a través del proyecto 009-2012: *Evaluación de residuos de contaminantes químicos en productos apícolas como indicador ambiental*; al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA. Universidad Nacional de Colombia y al Proyecto de investigación de CORPOICA “Efecto de factores genéticos, medio ambientales y de manejo sobre la calidad y la producción de miel y polen en cinco cultivos frutícolas promisorios exportables de Colombia”, financiado por Colciencias.

## Referencias

- Verde, M. M. Apicultura y seguridad alimentaria. *Cuban J. Agric. Sci.* **2014**, *48*, 25-31.
- Greenpeace. El declive de las abejas. Peligros para los polinizadores y la agricultura de Europa [Internet]. 1st ed. Amsterdam: Greenpeace; p. 45. Report No.: 1. [http://www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/Agricultura-ecologica/el\\_declive\\_de\\_las\\_abejas.pdf](http://www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/Agricultura-ecologica/el_declive_de_las_abejas.pdf) [Consultado 27 de marzo de 2016].
- Przybylowski, P.; Wilczynska A. Honey as an environmental marker. *Food Chemistry*. **2001**, *74*, 3, 3289–291. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00153-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00153-4).
- Balayannis, G.; Balayannis, P. Bee Honey as an environmental bioindicator of Pesticides' Occurrence in Six Agricultural Areas of Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, *55* (3), 462–470. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-007-9126-x>.
- Anderson, J.; Wojtas, M. Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) contaminated with pesticides and polychlorinated biphenyls. *J. Econ. Entomol.* **1986**, *79*, 1200–1205. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/79.5.1200>.
- Rissato, R.; Galhiane, M.; Knoll, F.; de Andrade, R. Método multiresiduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador. *Quim. Nova*. **2006**, *29* (5), 950-961. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000500012>.
- OMS F. Programa conjunto fao/oms sobre normas alimentarias comité del codex sobre métodos de análisis y toma de muestras 29.ª reunión Budapest (Hungria), 10–14 de marzo de 2008 [Internet]. 1st ed. Budapest; p. 20. Report No.: CX/CF 08/2/10. [ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCCF/cccf2/cf02\\_10s.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCCF/cccf2/cf02_10s.pdf) (Consultado 27 de Agosto de 2016).
- OMS F. Programa conjunto fao/oms sobre normas alimentarias comité del codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes 38ª reunión La Haya, Países Bajos, 24-28 de abril de 2006. ALINORM 06/29/12 Mayo de 2006 [www.fao.org/input/download/report/657/al29\\_12s.pdf](http://www.fao.org/input/download/report/657/al29_12s.pdf) (Consultado 27 de Agosto de 2016).
- Cháfer-Pericás, C.; Maquieira, A.; Puchades, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2010**, *29* (9) 1038–1049. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.004>.
- Tette, P.; Guidi, L.; Abreu, G.; Fernandes, C. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta*. **2016**, *149*, 124-141. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.045>.
- Niell, S.; Jesús, F.; Pérez, C.; Mendoza, Y.; Díaz, R.; Franco, J. et al. QuEChERS adaptability for the analysis of pesticide residues in beehive products seeking the development of an agroecosystem sustainability monitor. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 4484-4492. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00795>.
- Rial-Otero, R.; Gaspar, E.; Moura, I.; Capelo, J. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. *Talanta*. **2007**, *71* (2), 503–514. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.033>.
- Rodríguez, D.; Díaz, A.; Ahumada-Forigua D.; Guerrero J. Desarrollo y optimización de una metodología multiresiduo por método Simplex para el análisis de plaguicidas en miel de abejas *Rev. Colomb. Quim.* **2013**, *42* (1), 16–30.
- Orso, D.; Martins, M.; Donato, F.; Rizzetti, T.; Kemmerich, M.; Adaime, M. Multiresidue determination of pesticide residues in honey by modified QuEChERS method and gas chromatography with electron capture detection. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25* (8), 355–1364. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140117>.
- Peters, F.; Drummer, O.; Musshoff, F. Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* **2007**, *165*, 2, 216–224. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021>.
- Ahumada-Forigua, D.; Zamudio A. Análisis de residuos de plaguicidas en tomate mediante el uso de QuEChERS y cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a espectrometría de masas. *Rev. Colomb. Quim.* **2011**, *40* (2), 227–246.
- Ahumada-Forigua, D.; Zamudio, A.; España, J. Matrix Effect in Pesticide Analysis by Ultra Fast Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 661-669. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532012000400011>.
- Blasco, C.; Vazquez-Roig, P.; Onghena, M.; Masia, A.; Picó, Y. Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography–ion trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures. *J. Chromatogr. A*. **2011**, *1218*, 4892–4901. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.045>.
- Anastassiades, M.; Lehotay, S. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86* (2), 412–431.
- Ahumada-Forigua, D.; Guerrero, J. Estudio del Efecto Matriz en el Análisis de Plaguicidas por Cromatografía de Gases. *VITAE*, **2010**, *17* (1), 51–58.
- SANTE/11945. Method Validation and quality Control Procedures for pesticide residues analysis in food and feed. [http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant\\_pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_11945\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf) (Consultado 28 de Agosto de 2016)

22. The R Project for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/> (Consultado 28 de Agosto de 2016).
23. Unión Europea. Reglamento (CE) No 396/200. Límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. <http://eur-lex.europa.eu/lexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:070:0001:0016:es:PDF> (Consultado 28 de Agosto de 2016)
24. García, C.; Herrero, S.; Pérez, J.; Moreno, B. A simplified Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe approach for the determination of trihalomethanes and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soil matrices by fast gas chromatography with mass spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta.* **2011**, 689 (1), 129–136. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.01.023>
25. Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tisdelen, B.; Oliva, J. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 389, 1697–1714. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1610-7>.
26. Anastassiades, M.; Tisdelen, B.; Scherbaum, E.; Stajnbaher, D. (eds). *Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis*. Pesticide chemistry: crop protection, public health, environmental safety; Wiley-VCH, Weinheim, 2007; pp. 89-101.
27. Kole, P.; Venkatesh, G.; Kotecha, J.; Sheshala, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical Chromatography*. **2011**, 25, 199–217. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.1560>.
28. White, J. Composition of honey, In: *Honey, A Comprehensive survey*; Crane, R., Ed.; Wiley: New York, 1975; pp 157–206.
29. Ahumada-Forigua, D.; Aparicio, L.; Fuentes, J.; Guerrero, J.; Checa, B. Comparación de dos aproximaciones para la estimación de la incertidumbre en análisis de residuos de plaguicidas mediante cromatografía de gases. *Rev. Colomb. Quim.* **2012**, 41 (3), 377–394.
30. Ahumada-Forigua, D.; Rodríguez, D.; Zamudio, A.; Mojica, A. Comparison of different approaches to estimate limits of detection for pesticide residues analysis in food. *Rev. Colomb. Quim.* **2012**, 41 (2), 227–242.

**Article citation:**

Zamudio, A. M.; Vanoy, N.; Díaz-Moreno, C.; Ahumada, D. A. Desarrollo y validación de un método multiresiduo para el análisis de plaguicidas en miel por UFLC-MS *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, 46 (2), 24-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.63014>



Carlos Doria Argumedo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ingeniería. Universidad de La Guajira

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

Recibido: 13 de Octubre de 2016. Aceptado: 8 de Febrero de 2017.

## Metales pesados (Cd, Cu, V, Pb) en agua lluvia de la zona de mayor influencia de la mina de carbón en La Guajira, Colombia

### Resumen

Con el objetivo de medir la influencia que ejercen las actividades mineras de la explotación del carbón sobre la calidad del aire en las comunidades ubicadas en el área de influencia al norte de Colombia, se realizó una medición de los niveles de los metales pesados Cu, Cd, V y Pb en 21 muestras de agua lluvia. Este estudio se realizó por periodo de un año, mediante espectrometría de absorción atómica electrométrica. El promedio de las concentraciones de los metales fueron: Cu  $23,47 \pm 13,97 \mu\text{g/L}$ , Cd  $4,72 \pm 3,29 \mu\text{g/L}$  y V  $11,25 \pm 6,75 \mu\text{g/L}$ . Los resultados sugieren que la atmósfera no se encuentra contaminada por Pb, pero las actividades mineras (las excavaciones y voladuras, la combustión de combustibles fósiles, de crudos de petróleo y gasoil, las fuentes de tráfico vehicular, etc.) afectan significativamente la presencia y los niveles de los demás metales incluidos en el estudio. La contaminación en la zona influye en que el agua lluvia no cumpla con las normas de calidad, tanto a nivel nacional como internacional, ya que los parámetros de pH y Cd superan los límites permisibles y por tanto no es apta para el consumo humano.

**Palabras clave:** actividades mineras, agua de lluvia, espectrometría de absorción atómica electrométrica, metales pesados.

## Heavy metals (Cd, Cu, V, Pb) in rainwater in the most influence area of the coal mine in La Guajira, Colombia

### Abstract

To measure the influence of coal mining activities on air quality in northern Colombia, a first approach was made to assess pollution by measuring the levels of the heavy metals Cu, Cd, V, and Pb in 21 samples of rainfall over a one year period, by the electrothermal atomic absorption spectrometry technique. The average concentrations of metals in the study area in wet precipitation were: Cu  $23.47 \pm 13.97 \mu\text{g/L}$ , Cd  $4.72 \pm 3.29 \mu\text{g/L}$  and V  $11.25 \pm 6.75 \mu\text{g/L}$ . The results suggest that the atmosphere is not polluted by Pb, but mining activities (excavation and blasting, combustion of fossil fuels, crude oil and gas oil, and vehicular traffic sources) may significantly affect the presence and the levels of the other studied metals. Contamination in the area makes rain water infringe the quality standards, both nationally and internationally, since the parameters of pH and Cd exceed the permissible limits, therefore it is not suitable for human consumption.

**Keywords:** mining activities, rainwater, electrothermal atomic absorption spectrometry, heavy metals.

## Metais pesados Cd, Cu, V, Pb) na água de chuva na área de influência da mina de carvão em La Guajira, Colômbia

### Resumo

A fim de medir a influência que exercem as atividades de mineração de carvão sobre a qualidade do ar nas comunidades localizadas na área de influência ao norte da Colômbia, foram medidos os níveis de metais pesados Cu, Cd, V e Pb em 21 amostras de água da chuva. Este estudo foi feito ao longo de um ano, mediante espectrometria de absorção atômica eletrométrica. As concentrações médias dos metais foram: Cu  $23,47 \pm 13,97 \mu\text{g/L}$ , Cd  $4,72 \pm 3,29 \mu\text{g/L}$  e V  $11,25 \pm 6,75 \mu\text{g/L}$ . Os resultados sugerem que a atmosfera não está contaminada por Pb, mas as atividades de mineração (escavação e detonação, a queima de combustíveis fósseis, petróleo bruto e diesel, e o tráfego de veículos) afetam significativamente a presença e os níveis dos outros metais incluídos no estudo. A poluição faz que a água da chuva não atenda aos padrões de qualidade, tanto a nível nacional como internacional, posto que os parâmetros de pH e Cd excedem os limites admissíveis e, portanto, fazem que a água seja imprópria para consumo humano.

**Palavras-Chave:** mineração, águas pluviais, espectrometria de absorção atômica eletrométrica, metais pesados.

## Introducción

La lluvia cumple un papel importante en la limpieza de la atmósfera, ya que a través de este proceso se remueven la mayor cantidad de iones presentes en la misma. La composición química del agua de lluvia varía de un lugar a otro y de una región a otra, debido a la influencia de fuentes locales (1), tanto naturales como antropogénicas (2). Conocer su composición es importante para entender el papel del transporte de los componentes solubles de la atmósfera y su contribución a las diferentes fuentes de contaminantes atmosféricos (3). Adicionalmente, el agua de lluvia funciona como un sumidero importante para la materia en forma de gases y partículas, incluyendo metales traza en la atmósfera y, por tanto, desempeña un papel importante en el control de las concentraciones de estas especies (4).

Por su parte, la composición química de las deposiciones atmosféricas depende de numerosos mecanismos físicos y químicos de los aerosoles y precursores de las emisiones, las reacciones químicas, y procesos de eliminación. Por lo tanto, la química de las deposiciones húmedas puede proporcionar ideas sobre la evolución temporal de la atmósfera y su contaminación, y ser utilizada como un indicador pertinente para evaluar los procesos naturales frente a influencias antropogénicas (5). De modo que, en áreas remotas, estos estudios ofrecen un gran potencial para aclarar los efectos de centros urbanos, complejos industriales y emisiones de la agricultura. Del mismo modo, para comprender los procesos que controlan la composición química de la atmósfera en las regiones remotas y los ciclos biogeoquímicos naturales (6).

Acerca de la composición, los componentes disueltos en el agua de lluvia se pueden dividir generalmente en tres grupos: (a) los aerosoles de sal marina, (b) los aerosoles terrestres (suelo polvo, las emisiones biológicas) y (c) los aportes antropogénicos (7). Estos últimos se relacionan con procesos industriales, combustibles fósiles, actividades mineras, incineración de residuos, emisiones del motor de vehículos, agricultura y fertilizantes, además de otras actividades humanas que emiten grandes cantidades de contaminantes atmosféricos (8).

Uno de los grupos de contaminantes atmosféricos que genera gran preocupación es el de los metales pesados debido a sus características tóxicas, potencialmente cancerígenas, y su persistencia en el medio ambiente (8). Los metales pesados son tóxicos para los organismos vivos, aunque algunos de ellos como el Pb y el Cd se encuentren en niveles bajos (9). Elementos traza como Cd, Pb y V pueden provocar alteraciones en la salud, dependiendo de sus concentraciones en la atmósfera y de la forma química bajo la que se presenten. Tales alteraciones pueden abarcar desde afecciones pulmonares y cáncer, hasta hemorragias cerebrales (10).

Tal como se mencionó, las principales fuentes de metales son la industria, la minería, la fundición de metales y las fuentes móviles (11). En particular, la minería de carbón a cielo abierto genera mayores impactos en el ambiente que la minería subterránea, dado que genera material particulado y contaminantes gaseosos que permanecen en el aire, es decir, no solo afecta el interior de las minas, sino también las áreas de influencia externas (12).

En la Guajira colombiana, la minería del carbón es la actividad más representativa en cuanto a extensión (69000 hectáreas) y explotación del recurso (30,2 millones de toneladas/año). La explotación es a cielo abierto y la compañía minera responsable es la más grande del país; la mina de carbón es una de las minas a cielo abierto más grandes del mundo (13). Lo anterior trae como consecuencia el aumento de los niveles de contaminación y deterioro de la calidad del aire en dicha zona (14).

Teniendo en cuenta que los metales Cu, Cd, V y Pb son considerados como unos de los contaminantes más significativos en la atmósfera, que la minería es una de las actividades humanas que más contribuyen a su incorporación al ambiente y que actualmente no existen contribuciones a la literatura de la química elemental del agua de lluvia en esta región de Colombia, el presente estudio ha tenido como objetivo principal la determinación de los niveles de estos metales en la precipitación húmeda en una de las zonas de mayor influencia de la mina de carbón. Lo anterior con el fin de identificar los efectos de esta fuente de emisión en el aumento y la acumulación de elementos traza en la atmósfera de esta región del país.

## Materiales y métodos

### Aspectos generales del régimen de vientos y lluvias de la zona de estudio

En La Guajira predominan vientos alisios, su régimen es estacional coincidiendo con los períodos de invierno y verano de diciembre a mayo con velocidades de 13 a 15 nudos y dirección preferencial del Norte, y de junio a noviembre con velocidades bajas. El régimen de lluvia es de tipo binomial caracterizado por los períodos de mayor precipitación (abril-junio, septiembre-noviembre) alternados con dos de menores lluvias (diciembre-marzo, julio-agosto). En términos de aportes, el segundo período de mayores lluvias es el que tiene más peso relativo frente al total anual con promedios hasta del 55% frente a un 20% del primer período. Las épocas de menores lluvias aportan un 25%. El patrón de distribución de las lluvias es simple, éstas se dan desde el noreste al sureste entre valores que van desde los 500 mm al año en la Alta Guajira, hasta valores que sobrepasan los 2000 mm en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta (15). Las zonas climáticas en el área de Cerrejón corresponden a las categorías cálido seco y cálido muy seco. Se presentan dos períodos lluviosos, en abril - mayo el primero, y entre octubre y noviembre, el segundo; con una precipitación promedio anual de 912 mm (16).

### Muestreos

El diseño del monitoreo, el montaje y la operación de los colectores de deposición húmeda está basado en las recomendaciones de la literatura (17, 18). Se colectaron muestras de agua de lluvia en tres de los sitios de mayor asentamiento humano del municipio de Barrancas (La Guajira, Colombia), cuyos territorios están conformados por planicies y pequeñas ondulaciones. Por la conformación de su topografía, solamente se presenta el piso térmico cálido; los suelos son bañados por las aguas de los ríos Palomino y Ranchería (19).

Desde el punto de vista socioeconómico Barrancas constituye el área carbonífera denominada El Cerrejón que se extiende a lo largo de 50 km en el valle del río Ranchería, entre la Sierra Nevada de Santa Marta y la Serranía de Perijá, cubriendo una extensión de 69364 hectáreas (20).

En la Figura 1 se muestra un mapa de la península de La Guajira y en la Figura 2 se detalla la ubicación de los lugares de toma de muestras: el punto 1 localizado en Barrancas (zona urbana), el punto 2 en la zona rural entre las comunidades de Barrancas y Los Magueyes y el punto 3 en Papayal; la recolección se hizo en el período de junio a diciembre de 2014 y enero a junio del 2015.

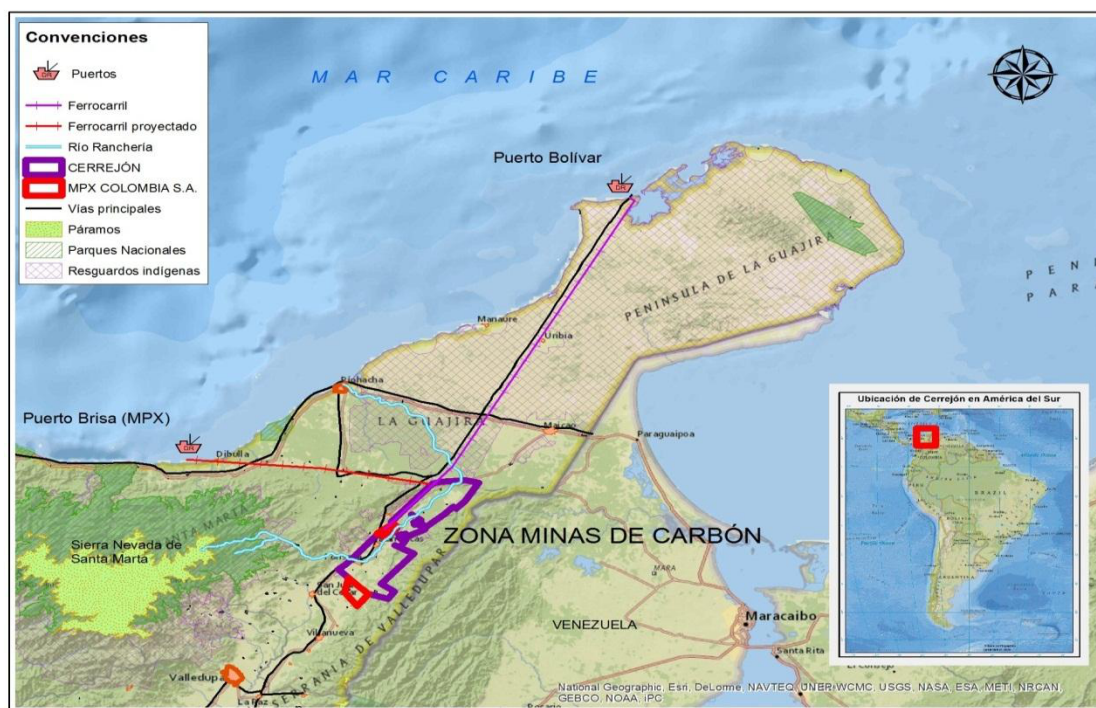


Figura 1. Ubicación geográfica de la zona minera de carbón El Cerrejón. La Guajira, Colombia

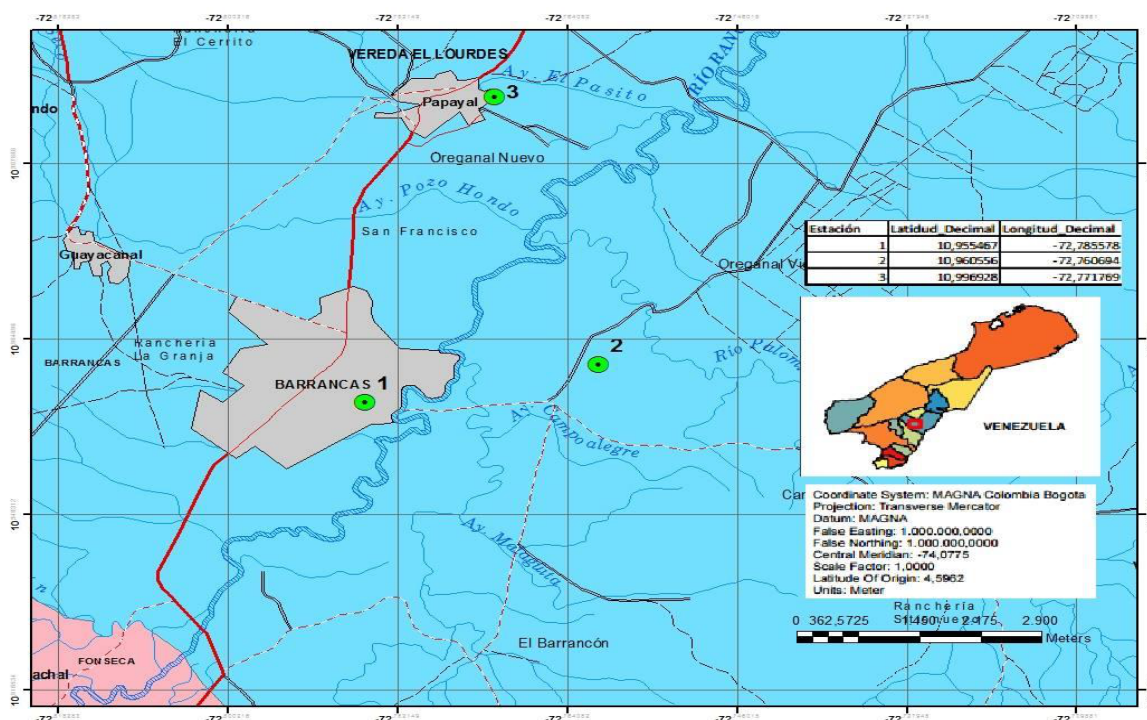


Figura 2. Puntos de monitoreo de agua de lluvia. Zona minera de carbón de La Guajira

Las muestras de agua de lluvia fueron recolectadas estrictamente por evento, utilizando un colector de tolva cuadrado, cuyo esqueleto metálico liviano (de ~ 2 m de altura) sostenía un embudo de polietileno de área 0,25 m<sup>2</sup> en su boca redonda. Éste se unió a un pequeño tubo, también de polietileno, de 2 cm de diámetro y 5 cm de largo, incrustado a través de un tapón de caucho por medio de una manguera de polietileno de 8 cm de longitud aproximadamente, en un envase de polietileno con capacidad de 4 L.

El diseño de la tolva consistía en cuatro triángulos isósceles con un ángulo central (opuesto a la base) de 90°, para una altura de 2 m (Figura 3). El colector que fue ubicado lejos de cualquier fuente de contaminación específica, se abría manualmente al comenzar el evento de lluvia y al terminar se cerraba, para evitar contaminación por deposición seca. Finalizado el evento de lluvia, se midió el volumen colectado e inmediatamente se separó una fracción de entre 100 y 150 mL, la cual fue envasada en un recipiente de polietileno y posteriormente refrigerada (aprox. 5 °C) hasta el momento de su análisis.

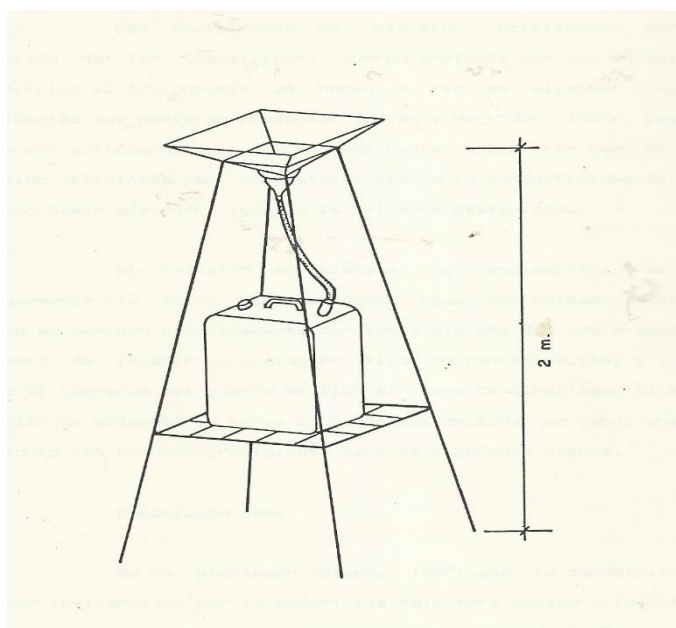


Figura 3. Esquema del montaje de colector para deposición húmeda

### Análisis químico

Después de recoger el agua de lluvia, se utilizó una alícuota de cada muestra para medir el pH. El medidor de pH se calibró antes de cada medición utilizando soluciones tampón estándar de pH 4,00 y 7,00 (21). Una segunda alícuota de cada muestra fue almacenada en un frasco de polietileno de 100 mL, preservada con HNO<sub>3</sub> 1:250 v/v (permitiendo un pH suficientemente bajo para preservar los metales) y refrigerada a 4 °C (22).

Los metales (Cu, Cd, V y Pb) fueron determinados utilizando la técnica de espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito (22), usando el equipo Perkin Elmer 3110. Las condiciones de operación se encuentran indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de operación de la determinación de metales (Cu, Cd, V y Pb) por espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito

Elemento	$\lambda$ (nm)	Slit	Pirolisis (°C)	Atomización (°C)
Cu	324,8	0,7	1200	2300
Cd	228,8	0,7	700	1600
V	318,4	0,7	1450	2650
Pb	283,3	0,7	850	1800

## Resultados y discusión

### Cantidad de lluvia

Se recogieron 21 muestras de agua de lluvia. El mayor número de eventos mensuales se produjo en septiembre, seguido de junio y octubre (8, 5 y 4, respectivamente); no se observaron eventos de lluvia en diciembre, enero, febrero y marzo. La precipitación mensual durante el período de estudio se presenta en la Figura 4. La precipitación más alta fue durante septiembre (246,4 mm), seguido de junio (125,2 mm) y octubre (91,4 mm). Los meses de diciembre, enero, febrero, marzo, diciembre son considerados los de temporada seca, coincidiendo esta situación con el comportamiento histórico del sitio.

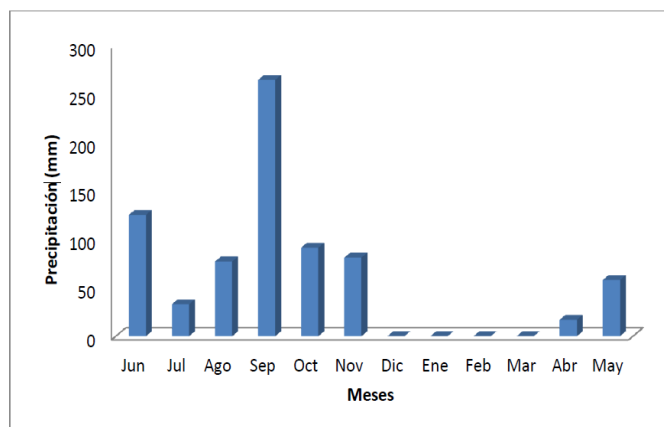


Figura 4. Variación mensual de ocurrencia de lluvia durante el período de estudio. Junio-diciembre (2014), enero-mayo (2015)

### Variación del pH de la lluvia

El pH de las precipitaciones individuales varió desde 4,40 hasta 7,80, tanto valores ácidos como alcalinos. En este estudio la media de pH valor por volumen ponderado (VWM, por su sigla en inglés) fue de 5,89, valor que supera al de la lluvia natural, de 5,6 controlada por el CO<sub>2</sub> disuelto (23). El pH de la lluvia durante el período de muestreo se indica en la Figura 5.

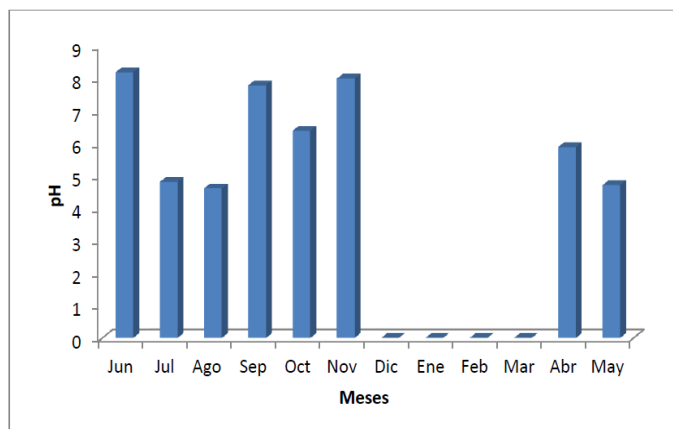


Figura 5. Media potencial mensual de pH valor por volumen ponderado en el agua de lluvia

El 38% de las muestras presentaron un pH por encima de 5,89 lo que indica la presencia de lluvias ácidas en la zona, esto se puede explicar teniendo en cuenta que el pH de la precipitación se modifica por la adición de componentes tanto ácidos como alcalinos (24). Por tanto, el carácter ácido de la lluvia sugiere la influencia de las actividades mineras del carbón que involucran procesos de combustión en los vehículos automotores (gasolina, petróleo crudo, aceite), combustión espontánea durante la excavación o voladuras que utilizan material explosivo. Estas actividades son fuentes potenciales de  $\text{NO}_2$  y  $\text{SO}_2$ , gases responsables de la formación de sustancias ácidas como  $\text{HNO}_3$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en la atmósfera (25, 26).

Se ha registrado una situación similar en zonas cercanas de Venezuela como Paraguaipoa (27) que presenta lluvias con un pH de 6,0, atribuido a la influencia de la mina de carbón. Del mismo modo, en Maracaibo se ha reportado un pH de 5,9, valor que es determinado por la presencia de la industria petroquímica y petrolera (Complejo Petroquímico El Tablazo, ubicado en el estado Miranda), la fábrica de cemento (Planta Mara), el tránsito automotor y las emisiones del suelo (28).

### Concentración de elementos traza en la precipitación

En la Tabla 2 se presenta el resumen estadístico de las concentraciones de los metales Cu, V y Cd medidos en las muestras de agua de lluvia que presentaron valores por encima del límite de detección (0,02  $\mu\text{g/L}$  para cada elemento).

Las concentraciones de Pb estuvieron por debajo del límite de detección (0,01  $\mu\text{g/L}$ ). No hubo una variación significativa en la concentración de elementos traza en la precipitación en los tres sitios de muestreo ( $p > 0,01$ ). Los valores mayores de concentración de metales se presentaron en las lluvias ocurridas después de periodos de sequía en junio de 2014 y abril del 2015, mientras que los valores menores se presentaron cuando la lluvia tuvo continuidad durante varios días (Figura 6).

Figura 6. Variación mensual de las concentraciones de metales ( $\mu\text{g/L}$ ) en la lluvia

Tabla 2. Niveles de concentración ( $\mu\text{g/L}$ ) de metales traza en la lluvia

Sitio	Elemento	Media ( $\mu\text{g/L}$ )	DS	CV	Máximo	Mínimo
1	Cu	25,21	14,38	0,57	41,3	3,8
	Cd	4,57	3,92	0,85	32,6	0,1
	V	12,17	7,31	0,60	26,7	4,8
2	Cu	24,13	15,10	0,62	39,5	3,3
	Cd	3,98	3,08	0,77	30,2	0,6
	V	11,23	6,73	0,60	24,2	3,9
3	Cu	21,07	12,45	0,60	38,7	2,9
	Cd	5,60	2,88	0,51	35,1	1,2
	V	10,34	6,21	0,60	20,9	4,1

DS =Desviación estándar, CV =Coeficiente de variación  
En todos los casos el número de muestras fue 21

Gratz y Miller (29) y Wetang'ula y Wamalwa (5) en sus estudios también observaron que las concentraciones altas se presentan típicamente en las primeras precipitaciones seguidas después de épocas de sequía prolongadas, lo que sugiere que la mayoría de los elementos traza se eliminan durante el inicio del periodo de las precipitaciones, y se van diluyendo a medida que van transcurriendo el resto de los eventos. Se observa una correlación significativa entre el Cd y V ( $R^2 = 0,73$ ;  $p < 0,01$ ) y Cu y V ( $R^2 = 0,63$ ;  $p < 0,01$ ), pero sin significancia entre el Cd y Cu ( $R^2 = 0,42$ ;  $p < 0,01$ ), lo que sugiere la existencia de más de una fuente de origen de estos metales.

El Vanadio y el Cadmio se encuentran en la corteza terrestre a bajas concentraciones (30), por lo que se considera que las principales fuentes de estos elementos deben estar relacionadas con actividades antrópicas, principalmente a través de la zona minera de carbón: los escapes de vehículos automotores (tractocamión, pala hidráulica, tractor, bus) que utilizan combustible pesado y la combustión de crudos de petróleo y gasoil. Adicionalmente, en la minería a cielo abierto se remueve una gran cantidad de material estéril para destapar los depósitos minerales, lo que genera aguas ácidas. Las aguas ácidas, a su vez, atacan otros minerales produciendo soluciones que acarrean elementos tóxicos al ambiente como el Cd o As (31).

En relación con lo anterior, en la cuenca del Witwatersrand de Sudáfrica existe una contaminación mayor de las aguas superficiales con Co, Mn, Ni, Pb y Zn como resultado del proceso de cianuración y oxidación de aguas ácidas de mina (32). El contenido de V en el petróleo crudo es de 5-1300 ppm (32) y las cenizas de la combustión del petróleo contienen más de 80% de  $V_2O_5$  (33). El V y en menor medida Ni y S han sido utilizados como indicadores de combustión de crudos de petróleo y gasoil en la totalidad de los estudios de composición química de partículas aerotransportadas (34).

Algunos autores han atribuido a la resuspensión de partículas de suelos margosos hasta un 40% del total del V encontrado en partículas aerotransportadas en una zona árido-desértica (10). Se puede considerar, en este sentido, que la presencia del V en la atmósfera está influenciada por la resuspensión de partículas del suelo aerotransportadas por acción de los vientos provenientes de contribuciones antropogénicas, generadas en zonas cercanas a La Guajira, como es el caso del complejo petroquímico de El Tablazo, Venezuela.

Por otro lado, la combustión del carbón es también una de las fuentes principales de Cu, Cr, Co, As, Se, así como de elementos litófilos en general (35). Se consideran, además, otras posibles fuentes como el desgaste de neumáticos y las quemaduras forestales en las zonas destinadas para cultivos. También se sugiere que los procesos de remoción de capas del suelo a través de voladuras y excavaciones realizadas en la mina, pueden contribuir a la emisión de Cu en la atmósfera (36).

Al comparar la concentración de Cd y V medidos en la lluvia en la zona minera de La Guajira (Tabla 3), se observa que son más altas que las reportadas en otras regiones del mundo, lo cual podría ser consecuencia de la ubicación de la zona de estudio en la región de calma ecuatorial que separa los movimientos de las masas de aire en los dos hemisferios. Esto dificulta el intercambio de contaminantes entre hemisferios, causando cierta asimetría en la distribución de dichos contaminantes (37).

También es de considerar que la presencia y concentración de metales en la atmósfera de La Guajira se ve influenciada por el movimiento de las corrientes marinas cálidas en la costa norte de Colombia, la intensidad de los vientos alisios del noreste y la presencia de cadenas montañosas en la zona sur que detienen los vientos.

### Idoneidad química para la recolección de agua lluvia para el uso por parte de la comunidad en la zona

La Guajira es uno de los territorios con mayor índice de escasez de agua (38), lo que obliga a la población que habita en las zonas rurales a la práctica del aprovechamiento de las aguas lluvias. Esta suele almacenarse para uso doméstico, para beber y preparar alimentos, y para uso agrícola.

Para la recolección del agua lluvia, que fue realizada a través de la escorrentía, algunos parámetros como pH, Cu o Cd (que fueron tenidos en cuenta en este estudio) se convierten en un problema importante (39). Los resultados indican que el agua de lluvia de la zona no se ajusta a las directrices de calidad de agua para consumo humano de la normativa nacional (40), pues el pH se encuentra por debajo del límite permisible (6,5–9,0) y el Cd supera el límite de 0,003 mg/L, valor que también es fijado por la Organización Mundial de la Salud (41). Por lo anterior, no se puede considerar como una fuente óptima de agua para uso doméstico.

### Conclusiones

En promedio, el agua de lluvia es ligeramente ácida ( $pH = 5,89$ ) lo que sugiere la presencia de especies ácidas o ligeramente ácidas. No se evidencia la presencia de Pb, pero las concentraciones de los metales traza Cu ( $23,47 \pm 13,97 \mu g/L$ ), Cd ( $4,72 \pm 3,29 \mu g/L$ ) y V ( $11,25 \pm 6,75 \mu g/L$ ) son elevadas y se encuentran por encima del rango de concentración reportado para otros sitios de todo el mundo (42–47). Lo anterior indica que la actividad antropogénica es una de las principales fuentes responsables de la presencia de estos metales. Las concentraciones de Cd ( $4,72 \pm 3,29 \mu g/L$ ) que se determinaron en las muestras de agua de lluvia fueron relativamente altas en comparación con las directrices de calidad del agua potable establecidas por los Ministerios de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, y de Salud de Colombia (40) y por la Organización Mundial de la Salud (41), por lo tanto se puede decir que el agua lluvia de la región no es óptima para consumo ni uso doméstico.

**Tabla 3.** Concentración media de elementos traza en precipitaciones en diferentes sitios del mundo

Sitio	Cu ( $\mu/L$ )	Cd ( $\mu/L$ )	V ( $\mu/L$ )	Referencia
Zona minera de La Guajira, Colombia	2,9-41,3	0,1-35,1	36,9-26,7	Este estudio
Ahvaz, Irán	*	0-1,97	*	(42)
Washington, USA	*	0,06-5,1	*	(43)
Atenas, Grecia	*	0,02-0,54	*	(44)
Maracaibo, Venezuela	59,9	17,2	3,0	(45)
Paris, Francia	7,2	0,26	*	(46)
Lulea, Suecia	255	*	*	(47)

\*No hay reporte

## Referencias

- Seinfeld, J.; Pandis, S. *Atmospheric Chemistry and Physics. From air pollution to climate change*. 2<sup>da</sup> ed. Wiley – Interscience: USA, 2006.
- Ramírez, E.; R, Miranda.; Gracia, Y., Balderas, I. Chemical composition of rainwater in northeastern México. *Atmósfera*, **2010**, 23 (3), 213-224.
- Khemani, L.; Momin, T.; Naik, M.; Prakasa, R.; Kumar.; R, Ramana. Impact of alkaline particulates on pH of rainwater in India. *Water Air Soil Poll.* **1985**, 24, 365-376. DOI: <http://doi.org/10.1007/BF00283789>.
- Samara, C.; Tsiouridou, R.; Balafoutis, Ch. Chemical composition of rain in Thessaloniki, Greece, in relation to meteorological conditions. *Atmos. Environ.* **1992**, 26 (3), 359-367. DOI: [https://doi.org/10.1016/0957-1272\(92\)90011-g](https://doi.org/10.1016/0957-1272(92)90011-g).
- Wetang'ula, G.; Wamalwa, H. *Trace Elements in Rainfall Collected around Menengai Area Kenya*. Proceedings World Geothermal Congress: Melbourne, Australia, 2015: pp 19-25.
- Xu, Z. and Han, G.: Chemical and strontium isotope characterization of rainwater in Beijing, China. *Atmos. Environ.*, **2009**, 43, 1954-1961. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.01.010>.
- Moaref, S.; Sekhavatjou, M.; Hosseini, A. Determination of Trace Elements Concentration in wet and dry Atmospheric Deposition and Surface soil in the Largest Industrial city, Southwest of Iran. *Int. J. Environ. Res.*, **2014**, 8 (2), 335-346.
- Montero, A. Evaluación de los métodos de biomonitorio con líquenes para estudiar el grado de contaminación atmosférica por elementos traza en La Habana. Tesis doctoral, Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear, Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas, La Habana, 2014.
- Taghinia, A.; Basavarajappa, H.; Qaid Saeed, A. Heavy Metal Pollution in Kabini River Sediments. *Int. J. Environ. Res.*, **2010**, 4 (4), 629-636.
- De Miguel, E. Geoquímica urbana de elementos traza. Tesis doctoral, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 1995.
- Monhanraj, R.; Azeet, T. Heavy Metals in Airborne Particulate matter of Urban Coimbatore. *Arch Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, 47. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-004-3054-9>.
- Ghose, M. Opencast coal mining in India: Assessing air pollutant emission rates Opencast coal mining in India. *Environ. Qual. Managem.* **2007**, 17, 35-51. DOI: <https://doi.org/10.1002/tqem.20150>.
- Corpoguajira-Corporación Autónoma Regional de La Guajira. *Atlas Ambiental del Departamento de La Guajira*. Riohacha, 2012.
- 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, 23-34. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0718-07642011000400004>.
- Corpoguajira-Corporación Autónoma Regional de La Guajira. *Condiciones climáticas de La Guajira año 2013*. División de Control y Monitoreo Ambiental. Reporte Anual. Riohacha. 2014.
- Gualdrón, R. *Cerrejón: Hacia la rehabilitación de las tierras intervenidas por la minería a cielo abierto*. Panamericana Formas e Impresos. 2009. Bogotá
- Galloway, J.; Likens, G. Calibration of collection procedures for the determination of precipitation chemistry. *Water, Air Soil Poll.* **1976**, 6, 241-258. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00182868>.
- Galloway, J.; Likens, G. The collection of precipitation for chemical analysis. *Tellus*. **1978**, 30, 71-82. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2153-3490.1978.tb00819>.
- ADEGUA-Asociación para el Desarrollo Educativo Cultural del Pueblo Guajiro. Mi Guajira. *Revista ADEGUA*. **2000**, 1, 7-12.
- AMBIENTEC. *Diseño de una red de monitoreo de recurso aire para los municipios y el corredor de transporte del carbón*. Riohacha. 1999.
- Dupre B.; Negrel, P.; Seimbille, F.; Allegre, C. Sr ratios variation during a rain event. *Atmos. Environ.* **1994**, 28, 617-620. DOI: [https://doi.org/10.1016/1352-2310\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/1352-2310(94)90038-8).
- American Public Health Association, *American Water Works Association Water Pollution Control Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22 ed. 2011. New York.
- Tuncel, S.; Ungor, S. Rainwater chemistry in Ankara, Turkey. *Atmos. Environ.* **1996**, 30, 2721-2722. DOI: [https://doi.org/10.1016/1352-2310\(95\)00434-3](https://doi.org/10.1016/1352-2310(95)00434-3).
- Charlson, R.; Rodhe, H. Factors controlling the acidity of natural rain water. *Nature*. **1982**, 295, 683-685. DOI: <https://doi.org/10.1038/295683a0>.
- Singh, A.; Mondal, G. Chemical characterization of wet precipitation events and deposition of pollutants in coal mining region, India. *J. Atmos. Chem.* **2008**, 59, 1-23. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10874-007-9092-8>.
- Doménech, X. *Química Atmosférica. Origen y efectos de la contaminación*. Miraguano Ediciones: Madrid, 1995.
- Morales, J. Estudio sobre la composición química de las deposiciones atmosféricas en la cuenca del Lago de Maracaibo. Tesis doctoral. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Caracas, Caracas, 1992.
- Sánchez, L. Estudio sobre la remoción de contaminantes atmosféricos en el aire de la ciudad de Maracaibo. Tesis de Maestría. Posgrado en Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, 1998.
- Gratz, L.; Keeler, G.; Miller, E. Long-term relationships between mercury wet deposition and meteorology. *Atmos. Environ.*, **2009**, 43, 6218-6229. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.08.040>.
- Snoeyink, V.; Jenkins, D. *Química del agua*. Ed. Limusa: México, 2004.
- Orozco, C.; Pérez, A.; González, N.; Rodríguez, F.; Alfayate, J. *Contaminación ambiental: una visión desde la química*. Ed. Thomson: España, 2003.
- Pirela, D. Composición elemental de las partículas suspendidas en la atmósfera de la región central de la Cuenca del Lago de Maracaibo. Tesis de Maestría. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, 1994.
- García, G. El Vanadio, un elemento ambiguo. *Acta Toxicol. Argent.* **2006**, 14 (2): 32-36.

34. Cornille, P.; Maenhaut, W.; Pacyna, J. Sources and characteristics of the atmospheric aerosol near Damascus, Syria. *Atmos. Environ.*, **1978**, *24A*, (5): 1083-1093. DOI: [https://doi.org/10.1016/0960-1686\(90\)90075-x](https://doi.org/10.1016/0960-1686(90)90075-x).
35. Kowalczyk, G.; Choquette, C.; Gordon, G. Chemical element balances and identification of air pollution sources in Washington. D.C. *Atmos. Environ.*, **1978**, *12*, 1143-1153. DOI: [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(78\)90361-x](https://doi.org/10.1016/0004-6981(78)90361-x).
36. Saavedra, J. Desmetalización (DM) de crudo pesado por el proceso de flotación. Tesis de Maestría, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, 1998.
37. Mehlmann, Y.; Warneck, P.; Atmospheric gaseous  $\text{HNO}_3$  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).
38. Instituto de Hidrología Meteorología y Estudios Ambientales. *Informe Anual sobre el Estado del Medio Ambiente y los Recursos Naturales Renovables en Colombia. Estudio Nacional del Agua Relaciones de demanda de agua y oferta hídrica*. Imprenta Nacional de Colombia: Bogotá, 2008.
39. World Health Organization. *Guidelines for drinking water quality*. Vol. 1. 3rd ed. Geneva, 2008.
40. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y Ministerio de la protección Social. *Resolución 2115: Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano*. Bogotá, 2007.
41. Organización Mundial de la Salud. *Guías para la calidad del agua potable*. Vol. 1. 3<sup>ra</sup> ed. Suiza, 2008.
42. Moaref, S.; Sekhavatjou, M.; Hosseini, A. Determination of Trace Elements Concentration in wet and dry Atmospheric Deposition and Surface soil in the Largest Industrial city, Southwest of Iran. *Int. J. Environ. Res.*, **2014**, *8* (2):335-346.
43. Melaku, S.; Morris, V.; Raghavan, D.; Hosten, C. Seasonal variation of heavy metals in ambient air and precipitation at a single site in Washington, DC. *Environ. Pollut.*, **2008**, *155*, 88-98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.10.038>.
44. Kanellopoulou, E. Determination of heavy metal in wet deposition of Athens. *Global NEST Journal*. **2001**. *3* (1), 45-50.
45. Medina, B. Evaluación físico-química del agua lluvia como indicador de contaminación atmosférica en algunas zonas de la ciudad de Maracaibo. Tesis de Maestría, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, 1990.
46. Garnaud, S.; Mouchel, J.; Chebbo, G.; Thévenot, D. Heavy metal concentrations in dry and wet atmospheric deposits in Paris district: Comparison with urban runoff. *Sci. Total Environ.* **1999**, *235* (1-5): 235-245. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00199-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00199-0).
47. Viklander, M. Substances in Urban Snow. A comparison of the contamination of snow in different parts of the city of Lulea, Sweden. *Water Air Soil Poll.* **1999**, *114* (3): 377-394. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1005121116829>.

**Article citation:**

Doria-Argumedo, C. Metales pesados (Cd, Cu, V, Pb) en agua lluvia de la zona de mayor influencia de la mina de carbón en La Guajira, Colombia *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, *46* (2), 37-44. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.60533>



## Evaluación de métodos de extracción para la obtención del ácido giberélico en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.)

### Resumen

El maíz (*Zea mays* L.) es el segundo cereal de mayor cultivo a nivel mundial el cual es empleado como materia prima en diferentes industrias. Hasta el momento no se han encontrado reportes de la obtención del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en esta planta. En el presente trabajo se compararon los métodos de extracción sólido-líquido por lixiviación y la extracción dinámica con disolvente asistida por sonicación (DSASE) para la obtención del GA<sub>3</sub> a partir de semillas germinadas de maíz. Los factores trabajados en la extracción por lixiviación fueron el método físico, el solvente y el tiempo, mientras que los parámetros por DSASE fueron el flujo, el solvente y el tiempo. La mayor concentración del GA<sub>3</sub> se obtuvo con el método DSASE (30,012 mg/kg), empleando como solvente acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20, v:v) a un flujo de 0,4 mL/min y un tiempo de extracción de 25,0 min. La identificación y la cuantificación del GA<sub>3</sub> se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD). Estos resultados evidenciaron que la DSASE es una alternativa novedosa para la obtención del GA<sub>3</sub>, dada su alta eficiencia, el bajo consumo de solvente y su simplicidad en la obtención del extracto.

**Palabras clave:** fitohormonas, DSASE, lixiviación, HPLC, *Zea mays* L.

## Comparison of different extraction methods for gibberelic acid obtention from corn (*Zea mays* L.) germinated seeds

### Abstract

Corn (*Zea mays* L.) is the second most cultivated cereal in the world and is used as raw material for different kind of industries. To date no reports about obtaining gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) from corn have been found. In the present study two methods for extracting solid samples were evaluated: lixiviation and dynamic sonication-assisted solvent extraction (DSASE), for obtaining gibberellic acid from corn germinated seeds. In lixiviation, the physical method (agitation and sonication), solvent, and time were the parameters analyzed; while in DSASE the variables were: solvent, flow, and time. The most efficient technique was DSASE employing acetonitrile-formic acid 5% (80:20, v:v) as solvent at a flow of 0,4 mL/min for 25,0 min, obtaining a concentration of 30,012 mg/kg gibberellic acid. Identification and quantification were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD). These results showed that dynamic sonication-assisted solvent extraction (DSASE) is a novel and powerful alternative technique for obtaining gibberellic acid, because of its high efficiency; low solvent consumption and simplicity in obtaining the extract.

**Keywords:** phytohormone, DSASE, lixiviation, HPLC, *Zea mays* L.

## Avaliação de metodologias de extração para a obtenção do ácido giberélico em sementes germinadas de milho (*Zea mays* L.)

### Resumo

O milho (*Zea mays* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo e é usado como matéria-prima em diferentes indústrias. Até a data não foram encontrados estudos da obtenção do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) neste cereal. Este trabalho teve como objetivo a comparação da metodologia de extração sólido-líquido por lixiviação e a metodologia de extração dinâmica com dissolvente assistida por sonicção (DSASE) para a obtenção do ácido giberélico a partir de sementes germinadas de milho (*Zea mays* L.). Na extração por lixiviação foram avaliados diferentes parâmetros: o método físico, o solvente e o tempo; e na metodologia DSASE estes parâmetros foram: o solvente, o fluxo e o tempo. A maior concentração de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) foi obtida com a metodologia DSASE, usando como solvente acetonitrila-ácido fórmico 5% v/v (80:20), fluxo de 0,4 mL/min e tempo de extração de 25,0 min. A identificação e a quantificação do GA<sub>3</sub> foi realizada mediante cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção de arreglo de diodos (DAD). Os resultados evidenciaram que a DSASE foi uma excelente alternativa para a obtenção do ácido giberélico, por apresentar alta eficiência, pouco consumo de solvente e ser uma técnica simples para a obtenção do extrato.

**Palavras-Chave:** fitohormônios, DSASE, HPLC, *Zea mays* L.

## Introducción

El ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) (Figura 1) es una fitohormona que hace parte de la familia de los diterpenos tetracíclicos de naturaleza ácida (1). Este ejerce efectos diversos en el crecimiento y desarrollo de la planta, promueve la germinación de las semillas que se encuentran en estado de dormancia, la elongación del tallo, el brote de las yemas y el desarrollo de los frutos (2, 3). La acción del  $\text{GA}_3$  en el crecimiento de los tejidos puede estar regulada por la modulación celular de sus concentraciones, por la habilidad de la célula para responder al estímulo de esta fitohormona, o por ambas (4).

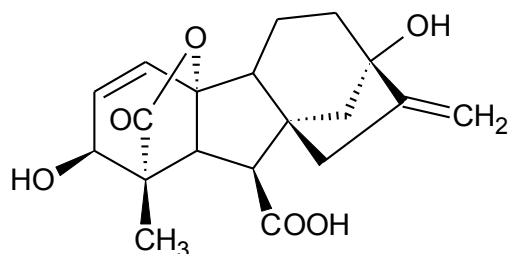


Figura 1. Estructura del ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ )

El  $\text{GA}_3$  ha sido obtenido a partir de diferentes tejidos vegetales utilizando principalmente métodos de extracción sólido-líquido, procesos en los cuales se extraen uno o varios solutos de un sólido mediante la utilización de un disolvente líquido. Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos pueden difundirse desde la matriz sólida a la fase líquida, lo cual produce la separación de los componentes constitutivos de la muestra (5). Para llevar a cabo la lixiviación se han utilizado diferentes tipos de disolventes tales como el metanol frío (6–9), el metanol acuoso (80% v/v) (10, 11), el metanol acuoso acidificado con ácido fórmico (0,05% v/v) (12), el acetato de etilo (13, 14), el acetonitrilo acidulado con ácido fórmico (5% v/v) (15, 16) y mezclas de isopropanol-ácido acético (17, 18). El período de extracción ha sido variable debido a que se han empleado tiempos cortos, una o dos horas (6, 16, 19, 20), hasta períodos prolongados, 24 o 48 h (21–23).

Otro método moderno de extracción sólido-líquido es la extracción dinámica con disolvente asistida por sonicación (DSASE). En este proceso la muestra es depositada en una celda por la cual hay paso continuo de solvente fresco y al mismo tiempo se aplican vibraciones acústicas con frecuencias por encima de 20 kHz, que promueven la transferencia de analitos desde la matriz en estudio hasta el disolvente. Esta técnica emplea los mismos solventes que la lixiviación, pero los tiempos de extracción y las cantidades de muestra son inferiores (24). La técnica de DSASE se ha empleado en la extracción de analitos como ésteres organofosforados, blanqueadores, colorantes y polifenoles, empleando flujos de solvente desde los 0,2 hasta 1,0 mL/min, con porcentajes de recuperación que se encuentran por encima del 85% (25–27).

Por otro lado, la cromatografía se encuentra entre las técnicas más empleadas para la identificación y la cuantificación del  $\text{GA}_3$ , que tiene como ventajas mayor eficiencia en la separación y alta especificidad (11, 13, 28). La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) es preferida sobre la cromatografía de gases ya que esta última requiere la derivatización previa del analito, lo cual aumenta el grado de complejidad del análisis (29–31).

Ahora bien, el  $\text{GA}_3$  ha sido evaluado por su importancia en la germinación y desarrollo de las plantas en diferentes especies vegetales como *Arabidopsis* (15), fresno blanco (21) y arroz (32). Sin embargo, no se han encontrado reportes de esta fitohormona en cereales como el maíz, el segundo cultivo más importante del mundo después del trigo (33). El maíz se cultiva en más de 140 millones de hectáreas con una producción anual de más de 580 millones de toneladas métricas. Toda la planta puede ser aprovechada y las aplicaciones posibles de este cereal incluyen alimento, forraje o materia prima para diferentes industrias (34). Adicionalmente, es de gran utilidad investigativa debido a su corto tiempo de germinación, lo que permite hacer diversidad de ensayos en los que se miden múltiples variables permitiendo alcanzar conclusiones de diferente índole (33).

El objetivo de este trabajo fue comparar los métodos de extracción por lixiviación y la extracción dinámica con disolvente asistida por ultrasonido (DSASE), con el fin de determinar el protocolo más eficiente para la obtención del ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) a partir de semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.).

## Materiales y métodos

### Reactivos químicos

El estándar del ácido giberélico empleado fue Sigma Aldrich (Sigma, USA); el acetonitrilo y el metanol fueron grado cromatográfico (Fisher Scientific, USA); el acetato de etilo y el ácido fórmico fueron grado analítico (Scharlau, España). El agua fue purificada empleando un sistema Direct-Q (Millipore, USA).

### Muestra de estudio

Se usaron semillas de maíz (*Zea mays* L.) variedad ICA-V305 tipo comercial producidas por la empresa Semillas del Pacífico (Cartago, Colombia). Se seleccionaron semillas sin daños visibles y con forma uniforme, con masa promedio de  $0,3878 \text{ g} \pm 0,0002 \text{ g}$  y volumen promedio de  $0,356 \text{ cm}^3 \pm 0,008 \text{ cm}^3$ .

### Preparación de la muestra

Las semillas de maíz previamente seleccionadas se sembraron en cajas Petri (100 x 15 mm), con papel absorbente como soporte. A cada caja se le adicionaron 12,0 mL de agua destilada y se colocaron en una incubadora Incucell de 222 L sin luz, a una temperatura de  $30,1 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ . La humedad del sistema fue de  $59,00\% \pm 3,39\%$ . Después de 48 h, las semillas se sacaron de la incubadora y fueron trituradas con ayuda de un molino eléctrico hasta obtener un material muy fino que se guardó en bolsa con sello hermético y en nevera a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  para su posterior extracción (35).

### Método de extracción sólido-líquido (lixiviación)

Para la extracción del  $\text{GA}_3$  mediante lixiviación se emplearon tres solventes diferentes: solvente B, acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20) (15); solvente C, metanol-ácido fórmico 5% (80:20) (13); solvente D, acetato de etilo (32). Se emplearon dos tiempos de extracción (1 y 2 h) y dos métodos extractivos diferentes, como se presenta a continuación.

### Método I: agitación orbital

La extracción se realizó utilizando el procedimiento planteado por Stirk y colaboradores (16), con algunas modificaciones. Se adicionaron 20,0 mL del solvente de extracción (solvente B, C o D) a 10,000 g de la muestra molida y se ésta se puso en un agitador orbital durante una o dos horas. Al cabo del respectivo tiempo, el material se decantó obteniéndose un sobrenadante y un pellet; el primero se retiró y se conservó, mientras que al segundo se le adicionó una nueva porción del respectivo solvente fresco y se reextrajo dos veces más. Los sobrenadantes obtenidos se mezclaron y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min, obteniéndose un nuevo sobrenadante el cual fue secado en rotaevaporador a 40 °C. El extracto sólido final se reconstituyó con acetonitrilo hasta un volumen de 5,0 mL previo a su análisis.

### Método II: Ultrasonido

Se adicionaron 20,0 mL del solvente de extracción (solvente B, C o D) a 10,000 g de la muestra molida y la mezcla se puso en un equipo de ultrasonido durante una o dos horas. En el transcurso de la extracción, la temperatura del agua en el baño nunca fue superior a 35 °C. Al cabo del respectivo tiempo, el material se decantó obteniéndose un sobrenadante y un pellet; el primero se retiró y se conservó, mientras que al segundo se le adicionó una nueva porción del respectivo solvente fresco y se reextrajo dos veces más. Los sobrenadantes obtenidos se unieron y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min, obteniéndose un nuevo sobrenadante el cual fue secado en rotaevaporador a 40 °C. El extracto sólido final se reconstituyó con acetonitrilo hasta un volumen de 5,0 mL previo a su análisis.

### Método de extracción DSASE

El procedimiento de extracción DSASE se basó en el trabajo previo de López y colaboradores (36) y se realizó con dos solventes diferentes: solvente B, acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20) (15); solvente C, metanol-ácido fórmico 5% (80:20) (13). Se empleó una celda de extracción de acero inoxidable de 3,0 mL que se llenó con 0,8000 g de muestra y se colocó en el interior de un baño ultrasonido; se controló la temperatura del agua para que nunca fuera superior a 35 °C. Posteriormente, el sistema se conectó a una bomba peristáltica que controló el flujo del solvente: (B o C) = 0,2 mL/min o 0,4 mL/min a través de la celda; la extracción se realizó por 12,5 min o 25,0 min. Al final de este periodo, se obtuvo el volumen de extracto deseado para cada una de las combinaciones de solvente y flujo.

### Condiciones cromatográficas

Para el análisis del GA<sub>3</sub>, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia Shimadzu Prominence (USA), equipado con un desgasificador DGU 205 (USA), un detector de arreglo de diodos (DAD) prominence SPD-M20A (USA), un horno Shimadzu CTO-10AS VP (USA) y un automuestreador Shimadzu SIL-10AF (USA). El software empleado para el análisis de los datos fue LCsolution Shimadzu (USA).

Para la identificación y la cuantificación, se empleó la técnica de HPLC con modificaciones de la metodología planteada por Bhalla y colaboradores (13). Se utilizó una columna Supelcosil™ LC-18-DB 5,0 µm (150 x 4,6 mm). La fase móvil fue acetonitrilo-ácido fórmico 0,01% con gradiente lineal como se detalla a continuación: acetonitrilo-ácido fórmico 0,01% (10:90) 5,0 min; (70:30) 40,0 min; (10:90) 10,0 min a un flujo de 0,5 mL/min. Una alícuota de 10 µL de cada solución que contenían las giberelinas se inyectó en el cromatógrafo y fueron detectadas a una longitud de onda de 195 nm. Previo al análisis cromatográfico, todas las muestras fueron filtradas a través de membranas (QLS) de 0,2 µm de poro.

### Recta de calibración

La recta de calibrado fue elaborada con un estándar del GA<sub>3</sub>, empleando siete niveles con concentraciones de 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 y 50,0 mg/kg. Las soluciones fueron preparadas al disolver el estándar con acetonitrilo.

### Análisis estadístico

La optimización de los métodos de extracción por lixiviación y por DSASE se realizó mediante un ANOVA multifactorial, previa verificación de los supuestos (normalidad, homocedasticidad e independencia). Las diferencias estadísticas presentadas entre los tratamientos se analizaron mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey. La comparación entre los métodos óptimos de extracción se realizó mediante la prueba t para diferencia de medias independientes con varianzas iguales, previa verificación de tal igualdad por el test F. Los análisis fueron realizados empleando el software Statgraphics centurión XI en modo demo.

## Resultados y discusión

### Recta de calibración

El modelo obtenido a partir de la recta de calibración explica el 99,51% de la variabilidad en las áreas calculadas en función de la concentración. El límite de detección (LOD) se determinó experimentalmente eligiendo la menor concentración del analito que presentó una señal cromatográfica integrable y el límite de cuantificación (LOQ) se calculó aplicando la expresión  $LOQ = 10/3 LOD$ . Los resultados de la recta de calibración se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de la recta de calibración

Analito	Ácido giberélico
$\beta_0$	0,00022
SD ( $\beta_0$ )	8,1543
$\beta_1$	21,2131
SD ( $\beta_1$ )	0,3051
R <sup>2</sup>	0,9951
LOD (mg/kg)	0,30
LOQ (mg/kg)	1,00

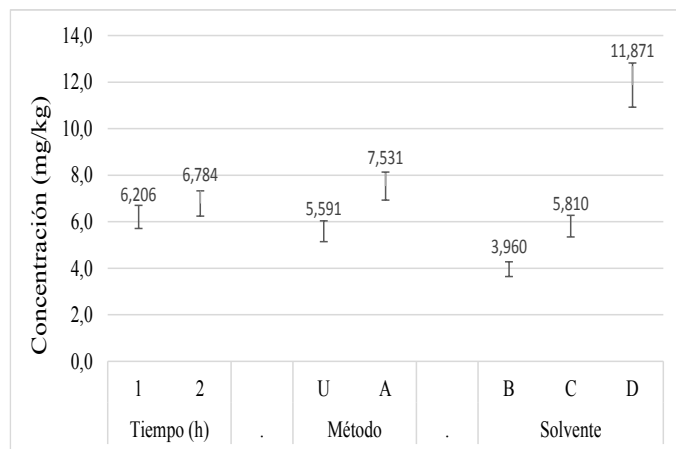
$\beta_0$  = Intercepto;  $\beta_1$  = Pendiente

SD  $\beta_0$  = Desviación estándar del intercepto

SD  $\beta_1$  = Desviación estándar de la pendiente.

## Evaluación de las condiciones de la extracción sólido-líquido

En el proceso de lixiviación para la obtención del GA<sub>3</sub> a partir de semillas germinadas de maíz, se determinó que los factores método y solvente de extracción tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la concentración del analito en estudio. Por el contrario, el tiempo de extracción (1 y 2 h) no mostró diferencias en la obtención del GA<sub>3</sub>. Los resultados obtenidos se presentan con una significancia del 5% (Figura 2).



**Figura 2.** Resultado de los factores empleados en la extracción por lixiviación [U: ultrasonido; A: agitación; D: acetato de etilo; C: metanol-ácido fórmico 5% (80:20); B: acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20)]

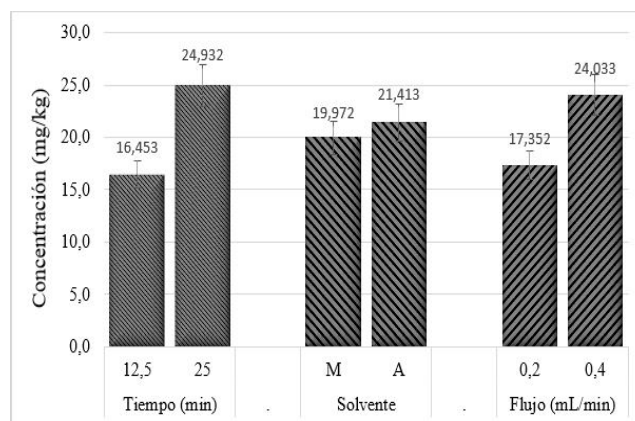
El solvente con el cual se obtuvo la mayor extracción del GA<sub>3</sub> fue acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20), obteniéndose una concentración de 11,871 mg/kg para el GA<sub>3</sub> (Figura 2). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Urbanová y colaboradores (15), quienes realizaron extracción del GA<sub>3</sub> en *Arabidopsis thaliana* empleando diferentes combinaciones de solvente y obtuvieron como mejor resultado la mezcla de acetonitrilo-ácido fórmico 5%. Vale la pena resaltar que el GA<sub>3</sub> es un analito de alta polaridad debido a la presencia de grupos funcionales como carboxilos, hidroxilos y lactonas en su estructura (Figura 1), por lo cual es más afín con solventes con índices de polaridad alta como el acetonitrilo y el metanol (37). Sin embargo, se podría decir que el acetonitrilo fue mejor en la extracción del GA<sub>3</sub>, debido a que este solvente es buen aceptor de protones, por lo cual interactúa fácilmente con solutos hidroxilados tales como el GA<sub>3</sub>, mientras que el metanol es un donador de protones e interacciona mayormente con solutos básicos (38). También es una ventaja la alta polaridad del acetonitrilo, dado que evita la extracción de compuestos lipídicos que pueden interferir en el proceso de cuantificación (39).

De los trabajados, el mejor método físico fue la agitación, pues se obtuvo una concentración de 7,531 mg/kg (Figura 2). Este resultado podría estar relacionado con la ausencia de ondas en el solvente extractor que pueden producir la degradación del analito y, por ende, conllevar a una disminución en la concentración del GA<sub>3</sub> extraído (40). De igual manera, el método de agitación no conduce a la disociación de las moléculas de agua por lo cual no se generan radicales hidroxilos que, eventualmente, podrían reaccionar con el analito en estudio (41).

En resumen, las mejores condiciones evaluadas para extraer el GA<sub>3</sub> por medio del método de lixiviación fueron: agitación como método físico, acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20) como solvente y una hora como tiempo de extracción. Este tiempo fue el elegido dado que permite extraer la misma cantidad de GA<sub>3</sub> que al emplear dos horas y, por tanto, fue el tratamiento más eficiente.

## Evaluación de las condiciones de la extracción DSASE

Para la extracción por DSASE, los factores flujo y tiempo tuvieron diferencias estadísticamente significativas, mientras que con el factor solvente no se presentaron diferencias estadísticamente considerables, con una significancia del 5% (Figura 3).



**Figura 3.** Resultado de los factores empleados en la extracción por DSASE [C: metanol-ácido fórmico 5% (80:20); B: acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20)]

El mejor flujo dentro de los dos niveles evaluados fue 0,4 mL/min, pues permitió una desorción rápida del analito presente en la matriz. Lo anterior debido a que, posiblemente, al haber solvente fresco en tiempos cortos, las interacciones solvente-matriz repetidas veces conllevaron a un equilibrio químico, lo que facilita la obtención de una mayor cantidad de analito extraído (24, 26). Finalmente, y dado que el factor tiempo presentó diferencias significativas, siendo 25,0 min el tiempo que permitió una mayor extracción con una concentración del GA<sub>3</sub> de 24,93 mg/kg, se escogió este valor como el óptimo para la extracción por DSASE (Figura 3).

Lo anterior permitió determinar que las mejores condiciones evaluadas para la extracción del GA<sub>3</sub> por el método de DSASE fueron: acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20) con 0,4 mL/min de velocidad de flujo y un tiempo de extracción de 25,0 min.

Al comparar los procedimientos de extracción por lixiviación y DSASE, se encontró que las concentraciones medias obtenidas por los dos métodos empleados fueron diferentes con un nivel de confianza del 95%. Estos valores, así como sus desviaciones estándar, se muestran en la Tabla 2.

En la Tabla 2 se observa que la extracción por DSASE fue la más eficiente, reportándose una concentración del GA<sub>3</sub> de 30,012 mg/kg. Esta técnica tiene varias ventajas sobre la extracción por lixiviación dado que presenta bajo consumo de solvente, emplea menor cantidad de muestra, disminuye drásticamente los tiempos de extracción y es menos laboriosa al momento de implementarse (25).

**Tabla 2.** Concentración de GA<sub>3</sub> obtenida con los métodos de extracción empleados Medias  $\pm$  desviación estándar

Método de extracción	Concentración GA <sub>3</sub> (mg/kg)
Lixiviación	15,062 $\pm$ 3,431
DSASE	30,012 $\pm$ 4,121

Además, al ser un sistema dinámico la muestra está continuamente expuesta al disolvente fresco, lo cual promueve la transferencia de analitos desde la matriz hasta el disolvente (24). Todo esto confirma la bondad de esta técnica por lo cual es usada en la actualidad para la obtención de diferentes biomoléculas.

## Conclusiones

Se evaluaron las mejores condiciones para la extracción del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en semillas de maíz (*Zea mays* L.) por lixiviación y por DSASE. Para la primera metodología los parámetros óptimos fueron agitación, con acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20) y una hora. Para el segundo proceso las condiciones óptimas fueron acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20), a un flujo de 0,4 mL/min y 25,0 min.

Se compararon los procedimientos de extracción por lixiviación y por DSASE, siendo este último el mejor método, debido a su alta eficiencia y correspondiéndose con las tendencias de la química verde al utilizar las mínimas cantidades de disolvente y muestra.

Se aplicó por primera vez una metodología de extracción por DSASE para la obtención del GA<sub>3</sub> en semillas de maíz, obteniéndose una concentración del analito de 30,012 mg/kg. Este resultado abre el camino para usar esta técnica en estudios posteriores en el campo de los productos naturales.

## Agradecimientos

A la vicerrectoría de investigaciones y posgrados de la Universidad de Caldas, por el financiamiento del proyecto 0455216.

## Referencias

1. Azcon-Bieto, J.; Talón, M. *Fundamentos de fisiología vegetal*, 2th ed. McGraw-Hill- Interamericana: Barcelona, 2013; pp 399-408.
2. Davies, P. J. Plant Hormones. *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 1<sup>st</sup> Edit. Springer – Science: New York, 1995; pp 66-80.
3. Ge, L.; Peh, C. Y. C.; Yong, J. W. H.; Tan, S. N.; Hua, L.; Ong, E. S. Analyses of gibberellins by capillary electrophoresis-mass spectrometry combined with solidphase extraction. *J. Chromatogr. A*. **2007**, *1159*, 242-249. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.041>.
4. Salisbury, F. B.; Ross, C. *Fisiología Vegetal*, 1<sup>ra</sup> Ed. Grupo Editorial Iberoamericano: Mexico, 1994.
5. Marcilla, A. *Introducción a las operaciones de separación*. Espagrac: España, 1998; pp 20-27.
6. Dumas, P.; Imbault, N.; Moritz, T.; Odén, P. C. Detection and identification of gibberellins in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) shoots. *Physiol Plant*. **1992**, *85*, 489-494. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1992.850312.x>.
7. Moritz, T. The use of combined capillary liquid chromatography/mass spectrometry for the identification of a gibberellin glucosyl conjugate. *Phytochem Anal*. **1992**, *3*, 32-37. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.2800030106>.
8. Hasan, O.; Ridoutt, B. G.; Davies, N. W.; Reid, J. B. Identification and quantification of endogenous gibberellins in apical buds and the cambial region of *Eucalyptus*. *Physiol Plant*. **1994**, *90*, 475-480. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb08804.x>.
9. Moritz, T. Biological activity, identification and quantification of gibberellins in seedlings of Norway spruce (*Picea abies*) grown under different photoperiods. *Physiol Plant*. **1995**, *95*, 67-72. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb00809.x>.
10. Huanpu, M.; Blake, P. S.; Browning, G.; Taylor, J. M. Metabolism of gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> in fruits and shoots of *Prunus avium*. *Phytochemistry*. **2001**, *56*, 67-76. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00354-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00354-X).
11. Macias, J. M.; Pournavab, R. F.; Reyes, M. H.; Benavides, A. Development of a Rapid and Efficient Liquid Chromatography Method for Determination of Gibberellin A<sub>4</sub> in Plant Tissue, with Solid Phase Extraction for Purification and Quantification. *Am J Plant Sci*. **2014**, *5*, 573-583. DOI: <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.55072>.
12. Kojima, M.; Kamada, T.; Komatsu, H.; Takei, K.; Kuroha, T. Mizutani M, et al. Highly Sensitive and High-Throughput Analysis of Plant Hormones Using MS Probe Modification and Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry : An Application for Hormone Profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol*. **2009**, *50*, 1201-1214. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp057>.
13. Bhalla, K.; Singh, S. B.; Agarwal, R. Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium strains*. *Environ Monit Assess*. **2010**, *167*, 515-520. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1068-5>.
14. Castillo, G.; Ortega, G.; Carabeo, V.; Delgado, G.; Michelena, G. Determinación cualitativa de giberelinas y auxinas por cromatografía de capa fina. ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. **2007**, *XLI*, 12-17.
15. Urbanová, T.; Tarkowská, D.; Novák, O.; Hedden, P.; Strnad, M. Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*. **2013**, *112*, 85-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.068>.
16. Stirk, W.; A.; Tarkowská, D.; Turečová, V.; Strnad, M.; Van Staden, J. Absciscic acid, gibberellins and brassinosteroids in Kelpak, a commercial seaweed extract made from *Ecklonia maxima*. *J Appl Phycol*. **2014**, *26*, 561-567. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0062-z>.
17. Manzi, M.; Gómez, A.; Arbona, V. Rapid and reproducible determination of active gibberellins in citrus tissues by UPLC/ESI-MS/MS. *Plant Physiol Biochem*. **2015**, *94*, 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.04.015>.
18. Müller, M.; Munné, S. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods*. **2011**, *7* (1), 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-37>.

19. Moritz, T.; Odén, P. C. Metabolism of tritiated and deuterated gibberellin A<sub>9</sub> in Norway spruce (*Picea abies*) shoots during the period of cone-bud differentiation. *Physiol Plant.* **1990**, *79*, 242-249. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1990.790205.x>.
20. Moritz, T.; Philipson, J. J.; Oden, P. C. Detection and identification of gibberellins in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) of different ages and coning ability by bioassay, radioimmunoassay and gas chromatography - mass spectrometry. *Physiol Plant.* **1989**, *75*, 325-332. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb04634.x>.
21. Stinemetz, C. L.; Roberts, B. R. An Analysis of the Gibberellic and Absciscic acid content of white ash seeds. *J Arboric.* **1984**, *10* (10), 283-285.
22. Soriano, M. D.; Bottini, R. Gibberellin A<sub>3</sub> levels in bark and flower buds of peach (*Prunus persica* L.) before leaf fall. *Agriscientia.* **1992**, *IX*, 3-8.
23. Schneider, G.; Schaller, B.; Jensen, E. Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatographic Separation of Permethylated Free and Glucosylated Gibberellins: a Method for the Analysis of Gibberellin Metabolites. *Physiol Plant.* **1994**, *5*, 111-115. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.2800050305>
24. Sanchez, C.; Ericsson, M.; Carlsson, H.; Colmsjo, A.; Dyremark, E. Dynamic sonication-assisted solvent extraction of organophosphate esters in air samples. *J Chromatogr A.* **2002**, *957*, 227-234. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00318-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00318-7).
25. Sanchez, C.; Ericsson, M.; Carlsson, H.; Colmsjo, A. Determination of organophosphate esters in air samples by dynamic sonication-assisted solvent extraction coupled on-line with large-volume injection gas chromatography utilizing a programmed-temperature vaporizer. *J Chromatogr A.* **2003**, *993*, 103-110. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00355-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00355-8).
26. De Los Santos, M.; Batlle, R.; Salafranca, J.; Nerín, C. Subcritical water and dynamic sonication-assisted solvent extraction of fluorescent whitening agents and azo dyes in paper samples. *J Chromatogr A.* **2005**, *1064*, 135-141. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.072>.
27. Gu, X.; Cai, J.; Zhu, X.; Su, Q. Dynamic ultrasound-assisted extraction of polyphenols in tobacco. *J Sep Sci.* **2005**, *28*, 2477-2481. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.200500064>.
28. Sackett, P. H. High-Performance Thin-Layer Chromatography of Gibberellins in Fermentation Broths. *Anal Chem ACS.* **1984**, *56*, 1600-1603. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac00273a014>.
29. Huntley, R. P.; Jones, L. H.; Hanke, D. E. Cytokinins and gibberellins in sap exudate of the oil palm. *Phytochemistry.* **2002**, *60*, 117-127. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00099-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00099-7).
30. Hamayun, M.; Khan, S. A.; Khan, A. L.; Ahmad, N.; Nawaz, Y.; Sher, H.; et al. Gibberellin producing *Neosartorya* sp. CC8 reprograms Chinese cabbage to higher growth. *Sci Hortic.* **2011**, *129* (3), 347-352. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.046>.
31. Kang, S. M.; Radhakrishnan, R.; Latif, A.; Kim, M. J.; Park, J. M.; Kim, B. R.; et al. Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiol Biochem.* **2014**, *84*, 115-124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.001>.
32. Wu, Q.; Wu, D.; Duan, C.; Shen, Z.; Guan, Y. Hollow fiber-based liquid-liquid micro-extraction with osmosis: II. Application to quantification of endogenous gibberellins in rice plant. *J Chromatogr A.* **2012**, *1265*, 17-23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.066>.
33. Asturias, M. Á. Maíz de alimento sagrado a negocio del hambre. Acción Ecológica, Quito, 2004; pp 9-20.
34. FAO. *El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Las políticas de recursos hídricos y la agricultura*, Roma, 1993, pp 8-10.
35. Correa, Y. M.; Buriticá, L. M.; Rivera, J. D.; Penagos, J. P.; Torres, J. I. Optimización del protocolo para la extracción y la cuantificación de proteínas totales en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). *Rev Ciencias Basicas - UMNG.* **2017**, *13* (1), 60-64. DOI: <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.2756>.
36. López, Á. M.; Alvarez E.; Cortés, C.; Rosero, M.; Tabora, G.; Garzón, W.; et al. Implementación de una extracción dinámica con disolvente asistida por sonicación (DSASE) en matrices de hoja de *Erythroxylum coca* para el posterior análisis de cocaína por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID). *Sci Chromatogr.* **2016**, *8*, 119-124. DOI: <https://doi.org/10.4322/sc.2016.022>.
37. Xie, W.; Han, C.; Zheng, Z.; Chen, X.; Qian, Y.; Ding, H.; et al. Determination of Gibberellin A<sub>3</sub> residue in fruit samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2011**, *127*, 890-892. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.018>.
38. Urbanová, T.; Tarkowská, D.; Strnad, M.; Hedden, P. Gibberellins – terpenoid plant hormones: Biological importance and chemical analysis. *Collect Czech Chem Commun.* **2011**, *76*, 1669-1686. DOI: <https://doi.org/10.1135/cccc2011098>.
39. Robards, K.; Haddad, P. R.; Jackson, P. E. *Principles and practice of modern chromatographic methods*. Academic Press, San Diego, 1994; pp 326-329.
40. Özbek, B.; Ülgen, K. O. The stability of enzymes after sonication. *Process Biochem.* **2000**, *35*, 1037-1043. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00141-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00141-2).
41. Mason, T. J.; Cordemans, E. D. Ultrasonic intensification of chemical processing and related operations: A Review. *Chem Eng Res Des.* **1996**, *74*, 511-516.

**Article citation:**

Rivera, J. D.; Correa, Y. M.; Penagos, J. P. Evaluación de métodos de extracción para la obtención del ácido giberélico en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.) *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, *46* (2), 45-50. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.63015>



Cristian Camilo Giraldo Londoño<sup>1</sup>, Rogelio Ocampo-Cardona<sup>2</sup>,  
Luz Amalia Ríos-Vásquez<sup>3\*</sup>, Maby Mool Martínez Garzón<sup>4</sup>, Jhon Mauricio Aguirre Cortés<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Magister en Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química. Universidad de Caldas, Calle 65 No. 26-10, Manizales, Colombia. cricagilo@hotmail.com

<sup>2</sup>Dr. en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química. Universidad de Caldas, Calle 65 No. 26-10, Manizales, Colombia. rogelio.ocampo@ucaldas.edu.co

<sup>3</sup>Dra. en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química. Universidad de Caldas, Calle 65 No. 26-10, Manizales, Colombia. amalia.rios@ucaldas.edu.co

<sup>4</sup>Magister en Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química. Universidad de Caldas, Calle 65 No. 26-10, Manizales, Colombia. maby.martinez@ucaldas.edu.co

<sup>5</sup>Magister en Ingeniería-Ingeniería Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química. Universidad de Caldas, Calle 65 No. 26-10, Manizales, Colombia. Dirección actual: Universidad Católica, Manizales, Colombia. jaguirre@ucm.edu.co

\*Autor para correspondencia: amalia.rios@ucaldas.edu.co

Recibido: 10 de Noviembre de 2016. Aceptado: 21 de Febrero de 2017.

## Nanopartículas de paladio soportadas en hidroxisales laminar: uso potencial en reacciones de Sonogashira

### Resumen

En este artículo se reporta la síntesis de nanopartículas de paladio soportadas en hidroxisales de acetato de zinc y modificadas con un surfactante (LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> y LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup> respectivamente), mediante inserción de [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> y su posterior reducción con etanol en reflujo. Con la inserción de surfactante, la distancia interlaminar de la hidroxisal de partida (LHS-Zn-Ac) se incrementó de 13,8 Å a 29,8 Å, mientras que los materiales finales, que contenían paladio metálico registraron distancias interlaminares de 22,4 Å y 29,4 Å para LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> y LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup> respectivamente. Las hidroxisales de acetato de zinc y de surfactante con nanopartículas metálicas de paladio incorporadas fueron ensayadas como potenciales catalizadores en la reacción de Sonogashira partiendo de fenilacetileno y yoduros de arilo, particularmente yodobenceno o 2-yodofenol, dando lugar a difenilacetileno (32% de rendimiento de producto aislado y purificado) o 2-fenilbenzofurano (18%). Todos los materiales inorgánicos fueron caracterizados mediante las siguientes técnicas: difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de barrido (SEM y SEM-EDS), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR). Por su parte los compuestos orgánicos se caracterizaron por resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H-NMR y <sup>13</sup>C-NMR) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

**Palabras clave:** hidroxisales, laurilsulfato de sodio, paladio, acoplamiento C-C tipo Sonogashira, difenilacetileno, 2-fenilbenzofurano.

## Palladium nanoparticles supported in laminar hydroxide salts: potential use in Sonogashira reactions

### Abstract

This article reports the synthesis of palladium nanoparticles supported on zinc acetate hydroxysalts and modified with a surfactant (LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> and LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup> respectively), by insertion of [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> and its subsequent reduction with ethanol at reflux. With the surfactant insertion, the interlaminar distance of the starting hydroxysalt (LHS-Zn-Ac) increased from 13.8 Å to 29.8 Å, while the final materials containing palladium metal registered interlaminar distances of 22.4 Å and 29.4 Å for LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> and LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup> respectively. Zinc acetate hydroxysalt and surfactant with incorporated palladium metal nanoparticles were tested as potential catalysts in the Sonogashira reaction starting from phenylacetylene and aryl iodides, particularly iodobenzene or 2-iodophenol, giving diphenylacetylene (32% yield of isolated and purified product) or 2-phenylbenzofuran (18%). All inorganic materials were characterized by the following techniques: X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM and SEM-EDS), transmission electron microscopy (TEM) and Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR). The organic compounds were characterized by nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

**Keywords:** hydroxide salts, sodium lauryl sulfate, palladium nanoparticles, Sonogashira C-C coupling reactions, diphenylacetylene, 2-phenylbenzofuran.

## Nanopartículas de paládio suportadas em hidroxisais laminar: uso potencial em reações de Sonogashira

### Resumo

Neste artigo se reporta a síntese de nanopartículas de paládio suportadas em hidroxisais de acetato de zinco e modificadas com um surfactante (LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> e LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup> respectivamente), mediante inserção de [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> para depois fazer uma redução com etanol em reflujo. Com a inserção do surfactante, a distância interlaminar da hidroxisal inicial (LHS-Zn-Ac) aumentou de 13,8 Å até 29,8 Å, enquanto que os materiais finais que continham paládio metálico registraram distâncias interlaminares de 22,4 Å até 29,4 Å para LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> e LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup> respectivamente. As hidroxisais do acetato de zinco e do surfactante com nanopartículas metálicas de paládio incorporadas foram testados como potenciais catalisadores na reação de Sonogashira a partir de fenilacetileno e iodetos de arilo, particularmente iodobenzeno ou 2-iodofenol, levando respectivamente difenilacetileno (32% de rendimento de produto isolado e purificado) ou 2-fenilbenzofurano (18%). Todos os materiais inorgânicos foram caracterizados pelas seguintes técnicas: difração de raios X (XRD), microscopia eletrônica de varredura (SEM e SEM-EDS), Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Por outro lado, os compostos orgânicos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (<sup>1</sup>H-NMR y <sup>13</sup>C-NMR) e cromatografia gasosa acoplada à massa (GC-MS).

**Palavras-Chave:** hidroxisais, laurilsulfato de sodio, paládio, acoplamiento C-C tipo Sonogashira, difenilacetileno, 2-fenilbenzofurano.

## Introducción

En la actualidad hay un interés creciente por los materiales inorgánicos laminares, su manipulación permite especies huéspedes intercambiables que le confieren diferentes propiedades físicas y químicas al material sintetizado, dado que entre sus láminas se pueden alojar polímeros, biomoléculas, moléculas neutras o iones tanto orgánicos como inorgánicos (1, 2). Entre estos materiales laminares se encuentran los hidróxidos metálicos que poseen aniones, utilizados para la obtención de estructuras en dimensiones nanométricas, con reconocidas aplicaciones: como material de soporte para catalizadores (3, 4), en la industria como retardantes de llamas (5), tamices moleculares o intercambio de iones y adsorbentes (6, 7), entre otras.

Particularmente, las propiedades fisicoquímicas y aplicaciones de hidroxisales laminares (LHS) han sido poco estudiadas. Hay reportes de un compuesto relacionado, conocido como hidroxiaacetato de zinc (4, 8), con fórmula general  $Zn_3(OH)_8(A^{n-})_{2n} \cdot 2H_2O$ , en el que la cuarta parte de los octaedros coordinados al ion zinc es reemplazada por dos tetraedros coordinados al zinc, localizados por encima y debajo del plano, coordinando moléculas de agua en el vértice del tetraedro (9). Estos materiales pueden servir como soporte de especies metálicas para ser utilizados en reacciones de catálisis en fase heterogénea, permitiendo la reutilización del catalizador y proporcionando mayor utilidad industrial y, por lo mismo, beneficios económicos y ambientales.

Algunos de los métodos reportados en la literatura (10) para la síntesis de hidroxisales son: (i) método de coprecipitación, (ii) método sal-óxido y (iii) tratamiento hidrotérmico. Otros métodos se basan en reacciones de hidrólisis que se producen cuando se añade agua a complejos metálicos que se forman en las disoluciones de los cationes.

Por otra parte, el paladio es utilizado como catalizador en una variedad de reacciones orgánicas, dentro de las cuales las reacciones de acoplamiento C-C (11) juegan un importante rol en la química orgánica sintética, ya que sus productos tienen diversas aplicaciones como intermediarios en la preparación de productos naturales y compuestos bioactivos (12). Desde el punto de vista de la catálisis, las nanopartículas de paladio han sido usadas en una variedad de reacciones químicas incluyendo las reacciones de acoplamiento C-C tipo Heck, Suzuki, Sonogashira y Stille (13, 14).

Además de la síntesis de derivados de acetileno, la reacción de Sonogashira permite también la preparación de heterociclos condensados, lo cual ha sido demostrado en la síntesis de productos como vignafurano y cicerfurano (15, 16), productos de interés por su potencialidad farmacológica (17). Aunque hay reportes que describen el uso de nanopartículas de paladio soportadas en arcillas aniónicas modificadas en reacciones de Sonogashira (5, 18, 19), hasta la fecha no se ha reportado su uso en la obtención de heterociclos condensados.

Con la expectativa de que las moléculas de surfactante actúen como plantilla para aumentar el espacio interlaminar, el área superficial y la lipoficidad de las hidroxisales laminares de este estudio, similar a como se reportó en hidróxidos dobles laminares (20), se sintetizaron dos nuevos materiales laminares con nanopartículas de paladio soportadas (LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> y LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup>), mediante una modificación del procedimiento reportado por Martínez y colaboradores (21).

Se realizaron estudios preliminares de la actividad de estos materiales como potenciales catalizadores en reacciones de acoplamiento tipo Sonogashira, específicamente para la síntesis de difenilacetilenos y benzofuranos. El método utilizado se basa en el intercambio de la hidroxisal de acetato de zinc con surfactante seguida de intercambio con el anión tetracloropaladato ( $[PdCl_4]^{2-}$ ) y la posterior reducción del paladio allí contenido. En este artículo se describen los procedimientos llevados a cabo y los respectivos resultados.

## Materiales y métodos

### Reactivos

Los reactivos utilizados proceden de fuentes comerciales: Sigma-Aldrich: ZnO (99+% pureza),  $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$  (98+% pureza), 2-yodofenol (98%), fenilacetileno (98%), yoduro cuproso (CuI) (98%); Carlo Erba  $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$  (92%), Alfa-Aesar:  $K_2[PdCl_4]$  (99,99%) y Calbiochem: acetato de potasio (KOAc) (99,9%).

### Síntesis de materiales inorgánicos

En la Figura 1 se presenta la secuencia gráfica para la preparación de los materiales inorgánicos, cuyo procedimiento experimental se describe a continuación:

#### Etapa 1. Síntesis de hidroxisales de acetato de zinc (LHS-Zn-Ac)

La síntesis de hidroxisales de acetato de zinc se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado en la literatura (21). Se mezclaron 83 g (1 mol) de óxido de zinc (ZnO) con 310 g (1,4 mol) de acetato de zinc dihidratado ( $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ ) en 2,5 L de agua destilada y desionizada. La mezcla se agitó a 2000 rpm durante 34 h bombeando nitrógeno ( $N_2$ ) cada hora. Después de 34 h de reacción, la mezcla se dejó de agitar y el material se lavó dos veces con agua destilada y desionizada sin verificación de la desionización total, filtrando la mezcla con un sistema convencional de vacío. Se dejaron secar las muestras por dos días al aire libre, a temperatura ambiente, sin el uso adicional de solventes de secado. El producto final fue un sólido blanco, se pesó y se obtuvieron 406 g de LHS-Zn-Ac.

#### Etapa 2. Síntesis de LHS-Zn-Suf: intercambio de la hidroxisal de acetato de zinc con surfactante (laurilsulfato de sodio)

Se mezclaron 200 g de LHS-Zn-Ac y 203 g (0,7 mol) de laurilsulfato de sodio ( $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$ ) en 2,5 L de agua destilada y desionizada, bombeando nitrógeno ( $N_2$ ) cada hora; la mezcla se agitó a 2000 rpm durante 24 h bajo condiciones ambientales. Después, el material se lavó dos veces con agua destilada y desionizada filtrando la mezcla con un sistema convencional de vacío. Se dejaron secar las muestras durante cinco días al aire libre, a temperatura ambiente y sin el uso de solventes de secado. El producto final fue un sólido blanco del que se obtuvieron 141 g (LHS-Zn-Suf).

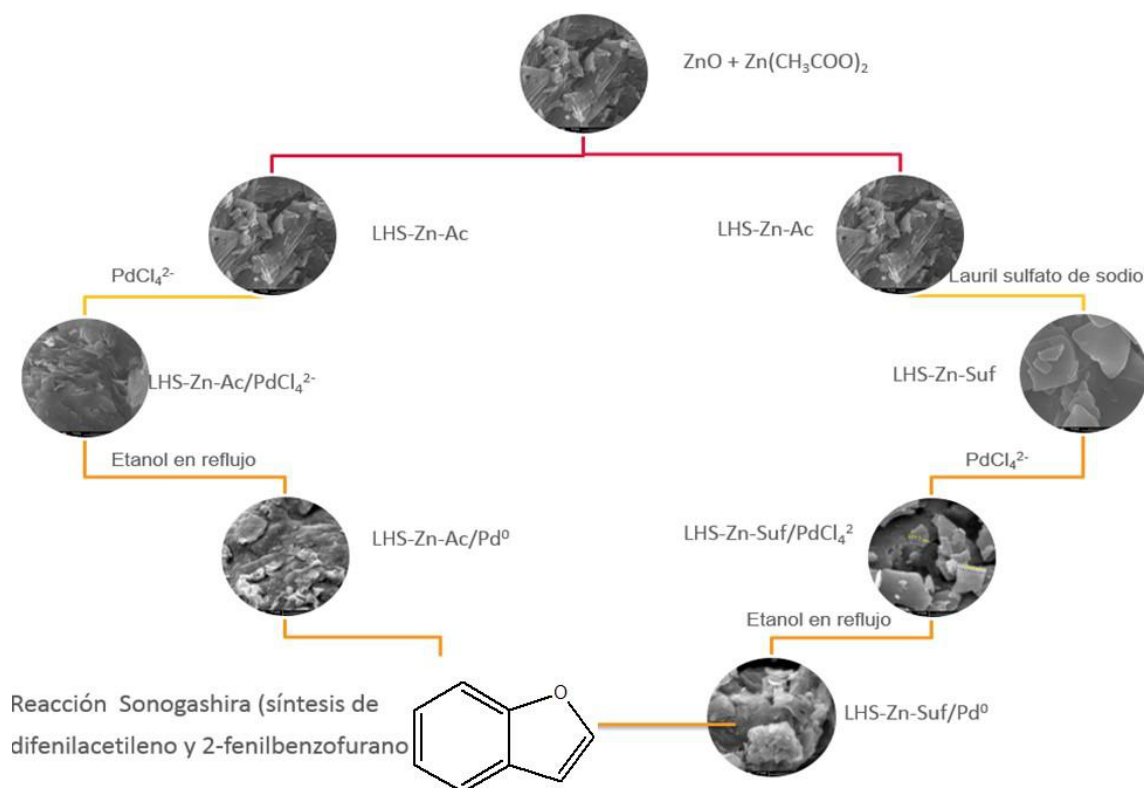


Figura 1. Síntesis de los materiales inorgánicos

### Etapa 3. Síntesis de LHS-Zn-Ac/ $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ y LHS-Zn-Suf/ $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ : intercambio de las hidroxisales precursoras con el anión $[\text{PdCl}_4]^{2-}$

Las dos hidroxisales sintetizadas (LHS-Zn-Ac y LHS-Zn-Suf) se sometieron a intercambio con tetracloropadato (II) de potasio ( $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ ), utilizando los procedimientos reportados en la literatura (21), pero variando la concentración del complejo de paladio. Se preparó una solución de  $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$  a una concentración de 2,7 g/L (el doble de la concentración utilizada por Martínez y colaboradores (21)), pesando 4,8 g del compuesto en 1,75 L de agua destilada y desionizada. Luego, se pesaron 17,5 g de LHS-Zn-Ac que se adicionaron a una batidora industrial y 1,75 L de la solución; se bombeó nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) durante 5 min cada hora.

Se tomó la precaución de realizar la reacción bajo atmósfera inerte con el fin de prevenir la formación de carbonatos que pueden ser derivados de la reacción del material con  $\text{CO}_2$ . La mezcla se agitó a 2000 rpm durante 48 h bajo condiciones ambientales para LHS-Zn-Ac y 24 h para LHS-Zn-Suf. Después, el material se lavó dos veces con agua destilada y desionizada filtrando la mezcla con un sistema convencional de vacío; se dejaron secar las muestras durante cinco días al aire libre, a temperatura ambiente y sin el uso de solventes de secado. Al final, se obtuvieron 12,9 g de LHS-Zn-Ac/ $[\text{PdCl}_4]^{2-}$  como un sólido café. El mismo procedimiento se llevó a cabo con LHS-Zn-Suf preparando una solución de  $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$  a una concentración de 2,7 g/L, a partir de 3,4 g en 1,25 L de agua destilada y desionizada. Luego se partió de 12,5 g del compuesto para obtener 9,1 g de LHS-Zn-Suf/ $[\text{PdCl}_4]^{2-}$  como un sólido café.

### Etapa 4. Síntesis de LHS-Zn-Ac/ $\text{Pd}^0$ y LHS-Zn-Suf/ $\text{Pd}^0$ : reducción de paladio en las hidroxisales modificadas

El paladio contenido en los materiales (LHS-Zn-Ac/ $[\text{PdCl}_4]^{2-}$  y LHS-Zn-Suf/ $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ ) se sometió a reducción a paladio metálico a partir de reflujo en etanol (21, 22). Se pesaron 12,0 g de LHS-Zn-Ac/ $[\text{PdCl}_4]^{2-}$  y se adicionaron 300 mL de etanol en un balón de fondo redondo de 500 mL. Se realizó el montaje de reflujo y se controló la temperatura en un baño de aceite entre 77-80 °C con una velocidad de agitación constante durante 2 h. La muestra se dejó decantar y se centrifugó 6 veces lavando el material con etanol (5000 rpm durante 5 min); se pasaron a un vidrio de reloj dejando secar al aire libre, a temperatura ambiente y sin el uso adicional de solventes, durante ocho días. Al final del proceso se obtuvieron 11,7 g de LHS-Zn-Ac/ $\text{Pd}^0$  como un sólido negro. El mismo procedimiento se llevó a cabo con 12,0 g LHS-Zn-Suf/ $[\text{PdCl}_4]^{2-}$  donde hubo una pequeña variación en la temperatura entre 78-82 °C, al final se obtuvieron 8,1 g de LHS-Zn-Suf/ $\text{Pd}^0$  como un sólido negro.

### Caracterización inorgánica

Las fases cristalográficas de los materiales en polvo preparados se visualizaron por medio de los patrones de difracción de rayos X, que se obtuvieron usando un difractómetro Rigaku MiniFlex II, equipado con una fuente de alto voltaje de 30 kV y 15 mA de corriente. Los análisis se realizaron a una velocidad de 5 °/min en el rango de 1,2-70° en 2 $\theta$ . El porcentaje del anión laurilsulfato en los materiales laminares se determinó mediante el método de sustancias activas al azul de metileno (SAAM), un colorante catiónico (23).

La morfología de los materiales se observó por microscopio electrónico de barrido de alta resolución con energía dispersiva (SEM por su sigla en inglés); el equipo empleado fue un modelo Quanta 250 de FEI. La fuente de electrones es de tungsteno y provee una resolución de 3.0 nm a 30 KV en todos los modos de operación. El microscopio cuenta con un sistema analítico de rayos X EDAX modelo Genesis Apex 2i para hacer análisis químico a nivel superficial.

La identificación de las nanopartículas formadas en la reacción de reducción se realizó en un microscopio electrónico de transmisión, (TEM por su sigla en inglés), Jeol 1200 EX. A partir de la espectroscopía de infrarrojo (IR) se analizó la presencia o ausencia de grupos funcionales claves. Los análisis fueron realizados en el equipo FT-IR marca ThermoFischer SCIENTIFIC referencia Nicole™ iS™ 5 con detector DTGS y divisor de haz KBr.

### Análisis de los compuestos orgánicos

Los productos orgánicos se monitorearon por cromatografía de capa delgada (TLC) que se llevó a cabo en silica gel (Kieselgel 60 F254 sobre aluminio) y se visualizó utilizando luz UV de 254 nm de longitud de onda. Además, las reacciones se siguieron por cromatografía de gases (GC) acoplado a espectrometría de masas (MS) analizadas en el cromatógrafo GC-MS-QP2010 Ultra marca Shimadzu.

Se utilizó una columna DB-1 para GC-MS (1% difenildimetilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m). La programación del horno inició en 50 °C (durante 2 min), se incrementó hasta 200 °C a 20 °C/min (durante 2 min) y, finalmente, se llevó a 300 °C a razón de 20 °/min (durante 3 min). Se analizó 1  $\mu$ L de la muestra en el inyector a 280 °C con un split 5 y una velocidad de flujo 0,7 mL/min. Con respecto a las condiciones de MS la temperatura de fuente de iones fue 290 °C y la temperatura de interfase de 300 °C. El tiempo de corte de solvente fue 6 min y el tiempo final del análisis fue 19,5 min.

Con el uso de cromatografía de columna se purificaron los productos de acoplamiento Sonogashira (difenilacetileno y 2-fenilbenzofurano), usando silica gel Kieselgel 60 marca Merck como fase estacionaria. Los compuestos fueron caracterizados por <sup>1</sup>H-NMR y <sup>13</sup>C-NMR, en un espectrómetro Bruker Avance II 400 MHz, utilizando CDCl<sub>3</sub>.

#### Síntesis de difenilacetileno

En un balón de tres bocas de 25 mL se mezclaron 114  $\mu$ L de yodobenceno (1 mmol), 140  $\mu$ L de fenilacetileno (1,25 mmol), 147 mg de KOAc (1,5 mmol) y 50 mg de catalizador (LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> o LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup>) en 2 mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF), bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a 500 rpm, controlando la temperatura de reflujo entre 110-112 °C durante 45 min. Se realizó el seguimiento de la reacción con TLC y GC-MS, luego la reacción se filtró con DMF y se realizó una extracción líquido-líquido con éter etílico-agua.

Después, se realizó cromatografía de columna eluyendo con 100% éter de petróleo, obteniendo un sólido blanco con punto de fusión 58-59 °C. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$ /ppm = 7,49-7,43 (m, 4H), 7,31-7,23 (m, 6H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 101 MHz):  $\delta$ /ppm = 131,6, 128,3, 128,2, 123,3, 89,4; MS (EI, 70 eV) *m/z* (% intensidad relativa, ion): 178 (100, [M<sup>+</sup>]), 152 (20), 126 (6), 89 (9), 76 (12).

#### Síntesis del 2-fenilbenzofurano

En un balón de tres bocas de 25 mL, se mezclaron 224 mg de 2-yodofenol (1 mmol), 147 mg de KOAc (1,5 mmol), 50 mg de catalizador (LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> o LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup>), 16 mg de CuI (cuando se realiza con co-catalizador) y se gotearon 140  $\mu$ L de fenilacetileno (1,25 mmol) en 2 mL de DMF, bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a 500 rpm, controlando la temperatura de reflujo entre 112-113 °C durante 45 min. Se realizó el seguimiento de la reacción con TLC y GC-MS. Luego, la mezcla de reacción se filtró con DMF y se realizó una extracción líquido-líquido con éter etílico-agua. Después se realizó cromatografía de columna eluyendo con 100% éter de petróleo, obteniendo un sólido blanco con un punto de fusión 119-120 °C. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$ /ppm = 7,82-7,76 (m, 2H), 7,53-7,15 (m, 7H), 6,95 (d, 1H, *J* = 0,8 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 101 MHz):  $\delta$ /ppm = 155,9, 154,9, 130,5, 129,2, 128,8, 128,6, 124,9, 124,3, 122,9, 120,9, 111,2, 101,3; MS (EI, 70 eV) *m/z* (% intensidad relativa, ion): 194 (100, [M<sup>+</sup>]), 165 (68), 139 (10), 115 (5), 97 (9), 82 (11).

## Resultados y discusión

### Materiales inorgánicos

En la Figura 2 se muestran los patrones de difracción de rayos X de los materiales de partida, ZnO y Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> así como el material sintetizado reportado en la literatura (21). Al comparar los patrones de difracción del ZnO y Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> con la Figura 2c (LHS-Zn-Ac) se observa la formación de un nuevo material laminar producto de la reacción entre éstos. El pico observado para LHS-Zn-Ac (Figura 2c) indica un tipo de reflexión que revela la formación de un espacio interlaminar correspondiente a 13,8 Å. Este espacio interlaminar es igual al reportado por Martínez y colaboradores (13,8 Å) (21). Los picos que aparecen correspondientes a 6,8 Å y 4,5 Å son asignados al segundo y tercer orden de reflexión del espaciamiento interlaminar, respectivamente.

Con el propósito de mejorar la lipoficidad de los catalizadores heterogéneos, el material sintetizado (LHS-Zn-Ac) se intercambió con laurilsulfato de sodio para aumentar el espacio interlaminar y el área superficial (20). En la Figura 3 se observa el patrón de difracción que ilustra el efecto del intercambio en la estructura del material, que evidencia un aumento en el espacio interlaminar de 13,8 Å a 29,8 Å. Lo anterior se puede atribuir al fenómeno de estratificación de las moléculas de laurilsulfato (9), teniendo en cuenta que la literatura reporta una longitud de 22,3 Å del anión surfactante (24). Los picos que aparecen a 6,1 ° y 9,4 ° en el eje 2 $\theta$  dan lugar a distancias de 14,3 Å y 9,4 Å respectivamente y son asignados, a su vez, al segundo y tercer orden de reflexión del espaciamiento interlaminar, mientras que el pico a 2,2 ° genera un espacio interlaminar de 40,9 Å que puede atribuirse a una fase diferente del material, debido a un ordenamiento diferente del ion surfactante.

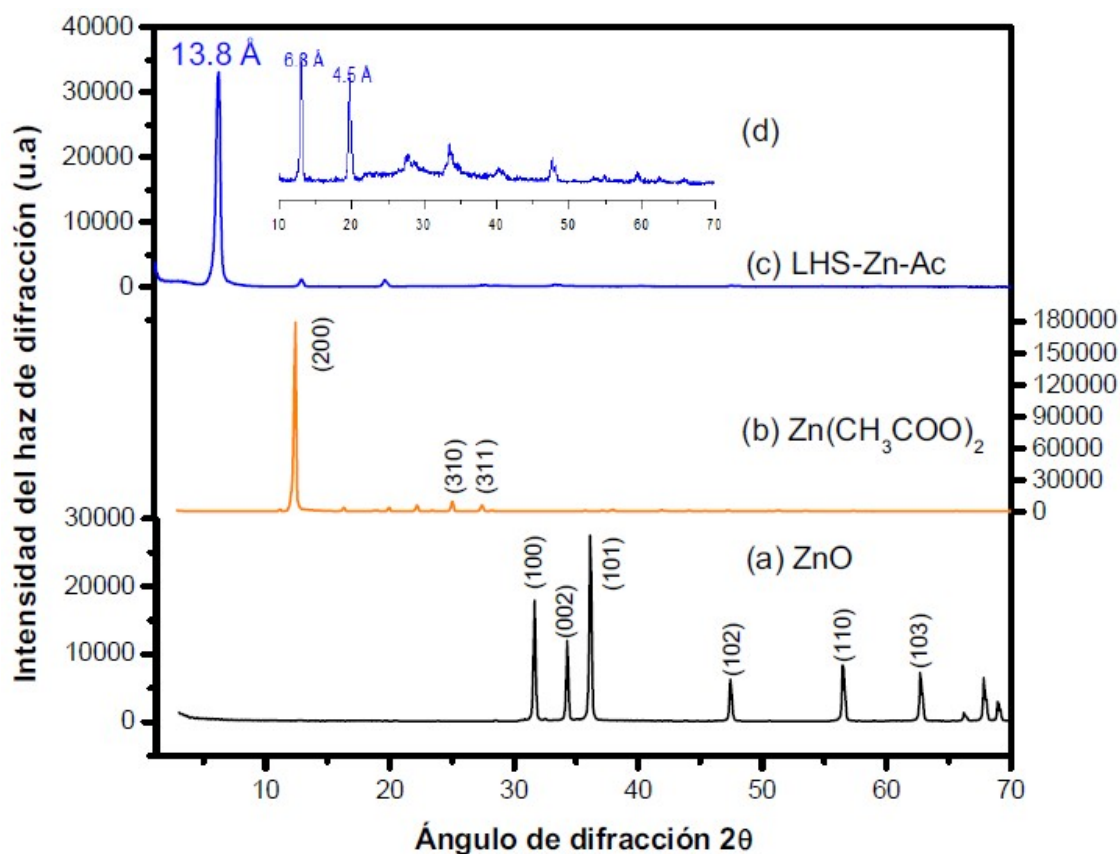


Figura 2. Patrones de Difracción de Rayos X (XRD). (a) Óxido de zinc (ZnO), (b) Acetato de zinc ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ), (c) LHS-Zn-Ac, (d) Aumento del patrón de 10° a 70° en 2θ de LHS-Zn-Ac

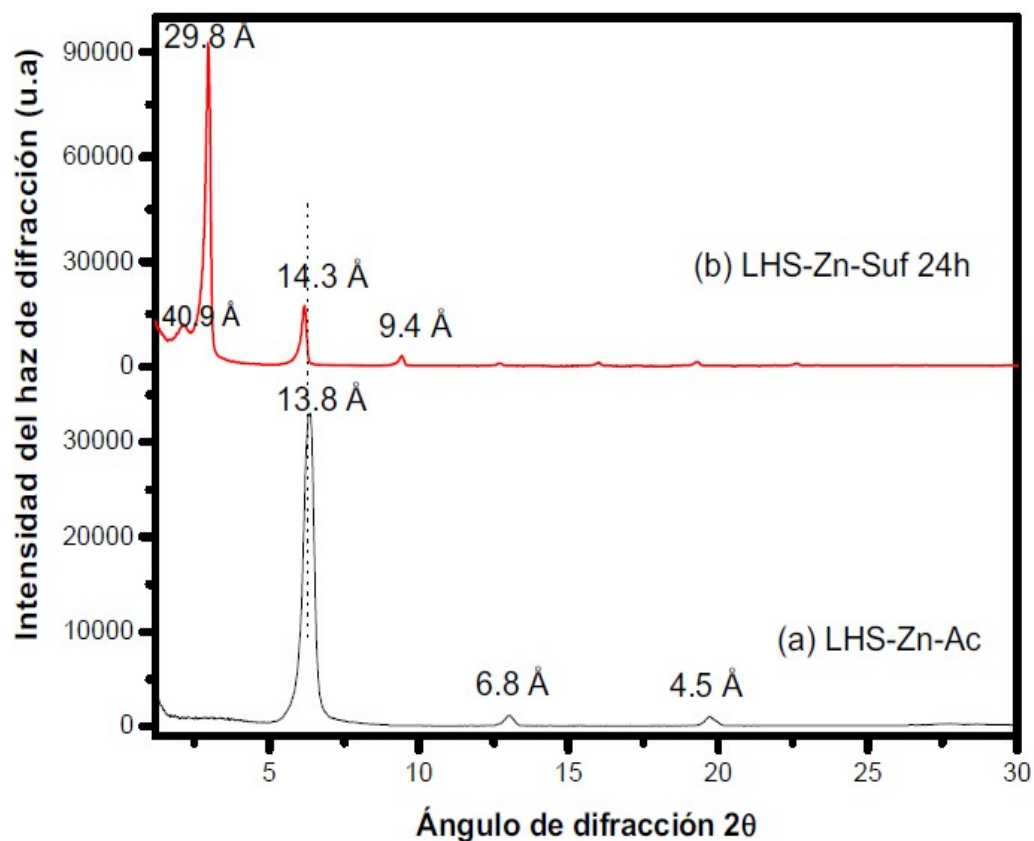


Figura 3. Patrones de Difracción de Rayos X (XRD). (a) LHS-Zn-Ac, (b) LHS-Zn-Suf a 24 h de reacción

Al contrastar los tres difractogramas de la Figura 4 se evidencian los cambios en el espacio interlaminar y la intensidad de las señales en los tres materiales sintetizados. El material precursor LHS-Zn-Suf presenta un espacio interlaminar a  $29,8 \text{ \AA}$  ( $3,0^\circ$  en eje  $2\theta$ ), que luego es intercalado con los complejos de paladio aumentando el espacio interlaminar a  $31,6 \text{ \AA}$  ( $2,8^\circ$ ); estos datos concuerdan con lo reportado por Shiyong y colaboradores (20). Finalmente, en la reducción de paladio se conserva parte de la interlámina mostrando la señal de paladio metálico en el material LHS-Zn-Suf/ $\text{Pd}^0$ , en el cual se evidencia un espacio interlaminar de  $29,4 \text{ \AA}$  ( $3,0^\circ$ ), además del pico alrededor de  $40^\circ$ , característico del paladio metálico (20). Al ampliar el patrón de  $20^\circ$  a  $50^\circ$  (Figura 4d) se observa una señal más clara de paladio y no se observan las señales características de ZnO, lo que permite sustentar que la estructura laminar del material permanece sin sufrir descomposición. El contenido estimado de laurilsulfato de sodio en el LHS-Zn-Suf/ $\text{Pd}^0$  fue del 2,1%, medido mediante el método sustancias activas al azul de metileno (23).

Por otra parte, en la Figura 4 también se observa que la intensidad de los difractogramas es diferente en el intercambio y reducción de las especies, mostrando un cambio de ordenamiento de la lámina. En la reducción final del material se observan los picos del precursor con menor intensidad, lo que permite deducir que parte del material conserva la interlámina mientras otra sufre exfoliación o delaminación (25, 26).

Lo anterior se puede evidenciar en la morfología del material con las imágenes de SEM, al observar un cambio en las láminas de la hidroxisil.

En la Figura 5 se comparan los difractogramas de (a) LHS-Zn-Ac, (b) LHS-Zn-Ac/ $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ , (c) LHS-Zn-Ac/ $\text{Pd}^0$ , y se observan los cambios en el espacio interlaminar y el ordenamiento de las estructuras sintetizadas a partir de la intensidad de las señales. El material precursor LHS-Zn-Ac presenta un espacio interlaminar de  $13,8 \text{ \AA}$  ( $6,4^\circ$  en el eje  $2\theta$ ), el material LHS-Zn-Ac/ $[\text{PdCl}_4]^{2-}$  presenta un aumento del espacio interlaminar a  $22,4 \text{ \AA}$  ( $3,9^\circ$ ) y finalmente en el LHS-Zn-Ac/ $\text{Pd}^0$  se conserva la interlámina presentando la señal de paladio metálico alrededor de  $40^\circ$ . Aunque se muestre el mismo espacio interlaminar después de la reducción, posiblemente se debe a la falta de reducción total del  $[\text{PdCl}_4]^{2-}$  o la presencia de nanopartículas muy pequeñas (inferiores a  $2 \text{ nm}$ ), como se evidencia en las imágenes de TEM. Al ampliar el patrón de  $20^\circ$  a  $50^\circ$  (Figura 5d) se observa una señal de paladio metálico alrededor de  $40^\circ$  lo que indica la presencia de metal en el material (27). No se observa ZnO (Figura 2a), lo que permite deducir que el material sintetizado no ha sufrido descomposición laminar.

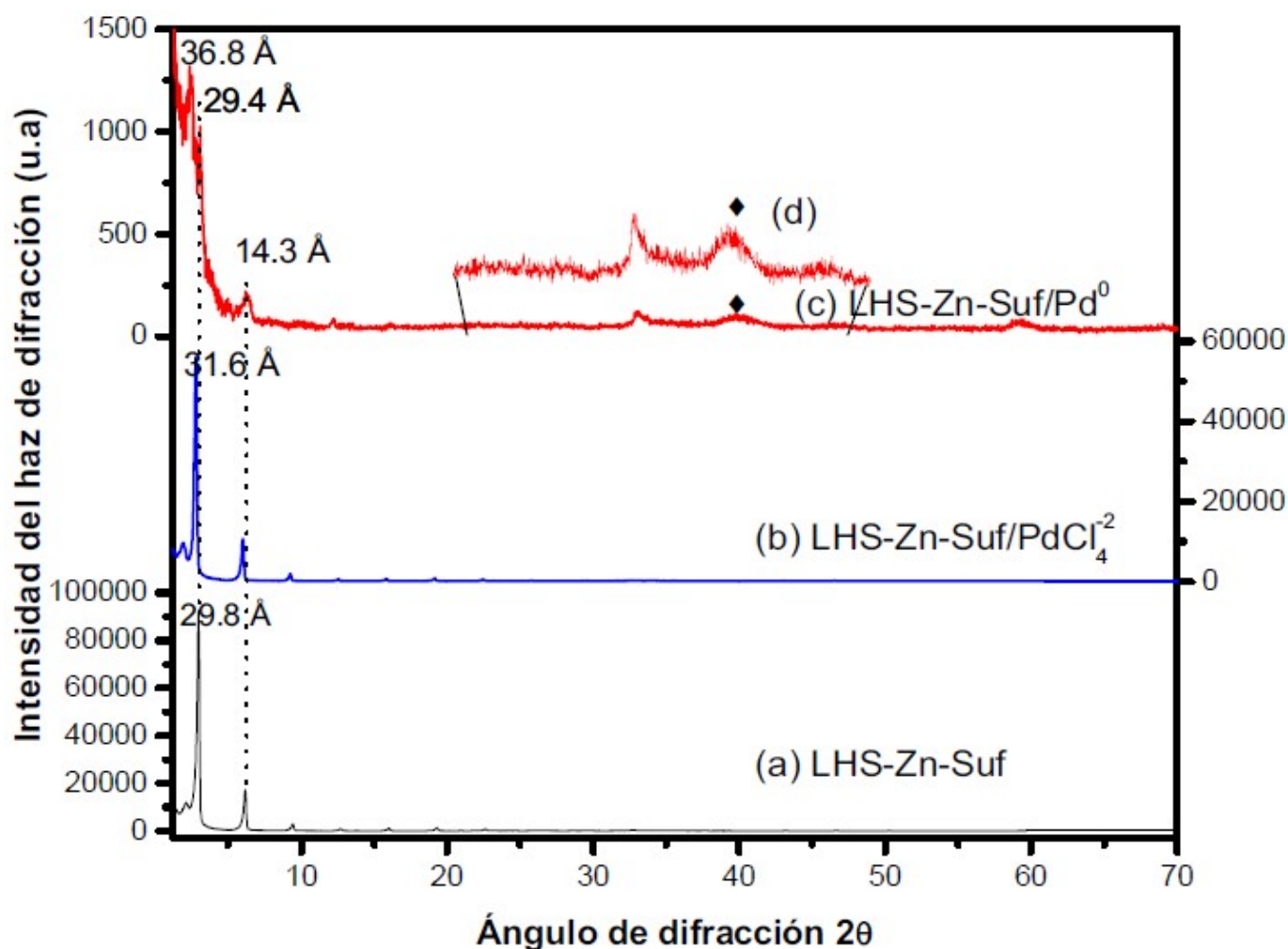


Figura 4. Patrones de Difracción de Rayos X. (a) LHS-Zn-Suf, (b) LHS-Zn-Suf/ $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ , (c) LHS-Zn-Suf/ $\text{Pd}^0$ , (d) Aumento del patrón de  $20^\circ$  a  $50^\circ$  de  $2\theta$  de LHS-Zn-Suf/ $\text{Pd}^0$

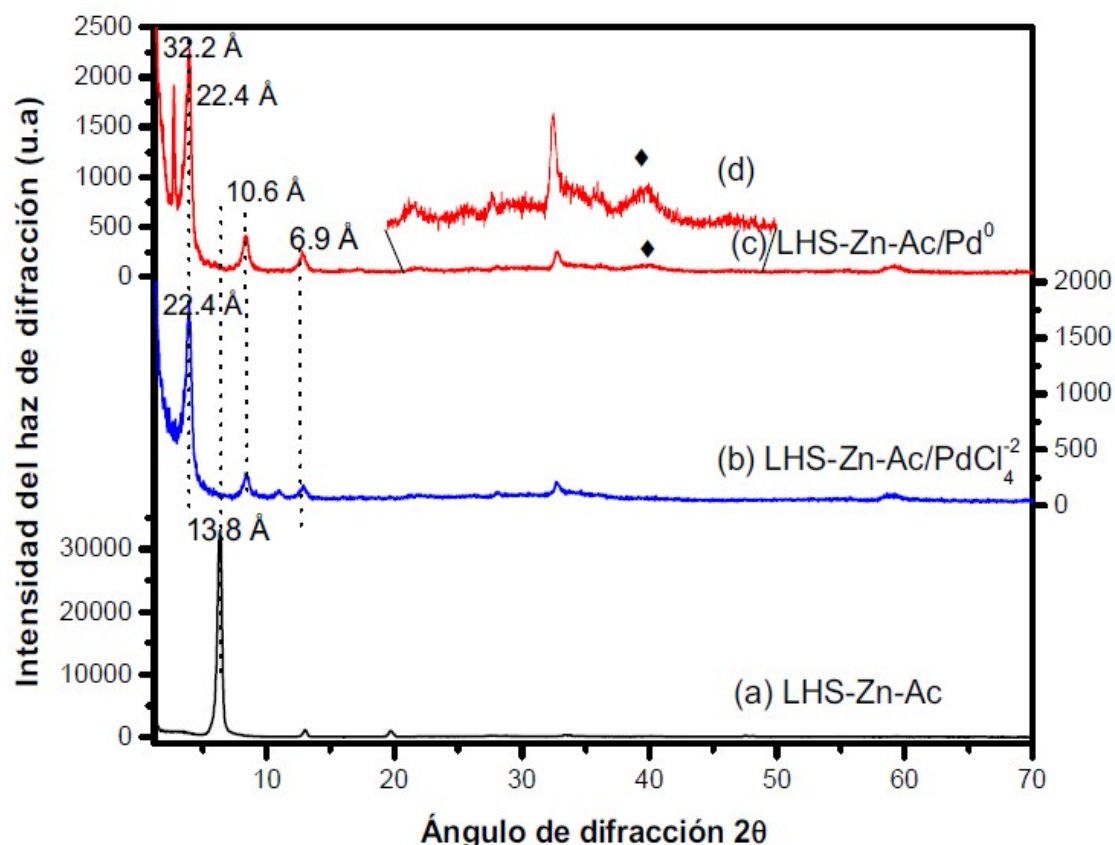


Figura 5. Patrones de difracción de rayos X. (a) LHS-Zn-Ac, (b) LHS-Zn-Ac/[PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>, (c) LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup>, (d) Aumento del patrón de 20 ° a 50 ° 2θ de LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup>

Al igual que el material LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup>, que sufrió exfoliación como lo muestran los picos 29,4 y 14,3 de la Figura 4, el LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> también sufrió delaminación por cuanto se observa la misma tendencia (Figura 5). El pico agudo que se observa a 2,7 ° en el eje 2θ del difractograma corresponde a un espacio interlaminar de 32,2 Å (Figura 5c), mostrando otra fase cristalográfica que puede atribuirse al reordenamiento de los iones acetatos y posiblemente a un contenido remanente de [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> sin reducir.

La Figura 6 muestra la morfología del material precursor (LHS-Zn-Ac) y el material intercambiado con laurilsulfato (LHS-Zn-Suf). Las microfotografías de ambos materiales evidencian la formación de láminas u hojuelas que se van modificando cuando se les inserta otras especies.

A partir de SEM-EDS, se realizó un análisis semicuantitativo de la composición porcentual de LHS-Zn-Ac y LHS-Zn-Suf. Los resultados evidencian que se incorpora azufre al material laminar, el cual proviene del laurilsulfato de sodio intercambiado con acetato (Tabla 1).

La morfología de los materiales sintetizados con acetato y surfactante sufre modificaciones durante el intercambio con el complejo aniónico de paladio y su posterior reducción a paladio metálico, que se ven reflejadas en las imágenes de las Figuras 7 y 8. Es evidente que la morfología de los materiales pierde uniformidad en el proceso, lo cual es coherente con las diferencias de intensidad observadas en los difractogramas (Figuras 4 y 5). Por su parte, la composición porcentual de los elementos en áreas específicas delimitadas de los materiales también se puede obtener cualitativamente a partir del análisis por SEM-EDS. Los resultados para LHS-Zn-Ac/[PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> y LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> se muestran en la Tabla 1, lo mismo que para LHS-Zn-Suf/[PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> y LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup>. En ambos casos, los cambios de composición de un material con respecto a otro, en la respectiva secuencia sintética, se deben a que la reducción del paladio libera aniones cloruro que quedan estabilizando las láminas de la hidroxisal (29). Por su parte, el aumento del Pd se debe posiblemente a la aglomeración de las nanopartículas de paladio en determinadas áreas de los materiales donde se focalizó el análisis.

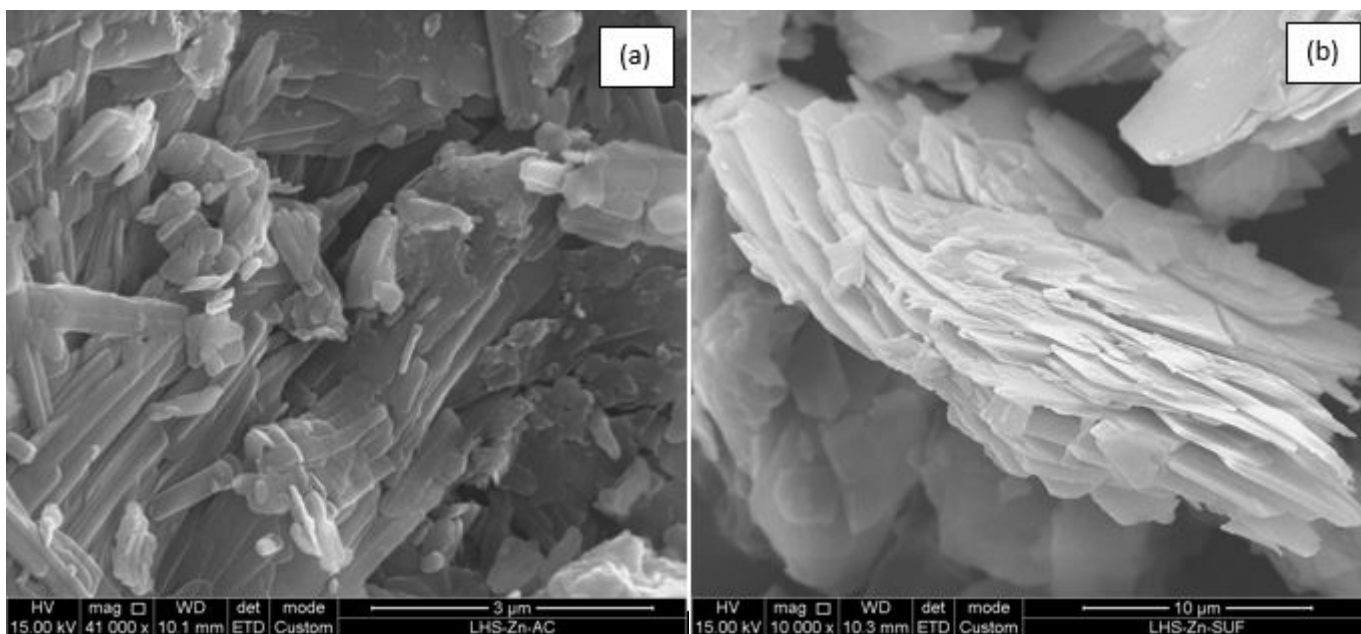


Figura 6. Imágenes de SEM para: (a) el material precursor LHS-Zn-Ac y (b) LHS-Zn-Suf

Tabla 1. Porcentajes de los elementos que conforman las hidroxisales estimados por la técnica de SEM-EDS

Material	LHS-Zn-Ac	LHS-Zn-Ac/[PdCl <sub>4</sub> ] <sup>2-</sup>	LHS-Zn-Ac/Pd <sup>0</sup>	LHS-Zn-Suf	LHS-Zn-Suf/[PdCl <sub>4</sub> ] <sup>2-</sup>	LHS-Zn-Suf/Pd <sup>0</sup>
Elemento	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
C	7,1	3,9	3,1	24,6	18,9	5,7
O	26,5	17,3	17,1	18,4	18,6	14,6
S				8,7	7,5	3,3
Zn	66,4	74,4	61,8	48,3	50,9	44,4
Cl		1,5	2,3		0,1	0,9
Pd		2,8	15,8		4,0	31,1

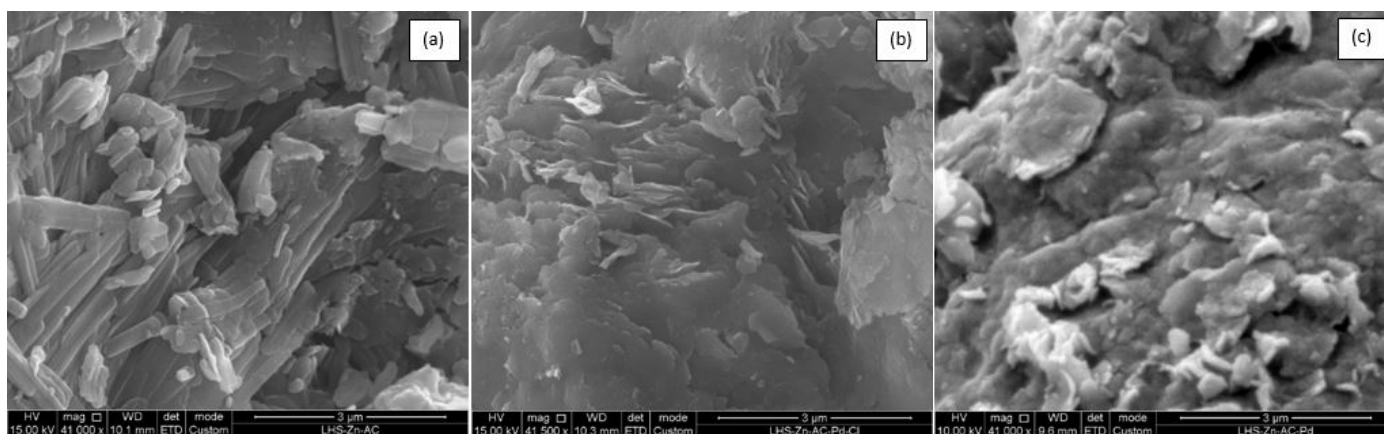
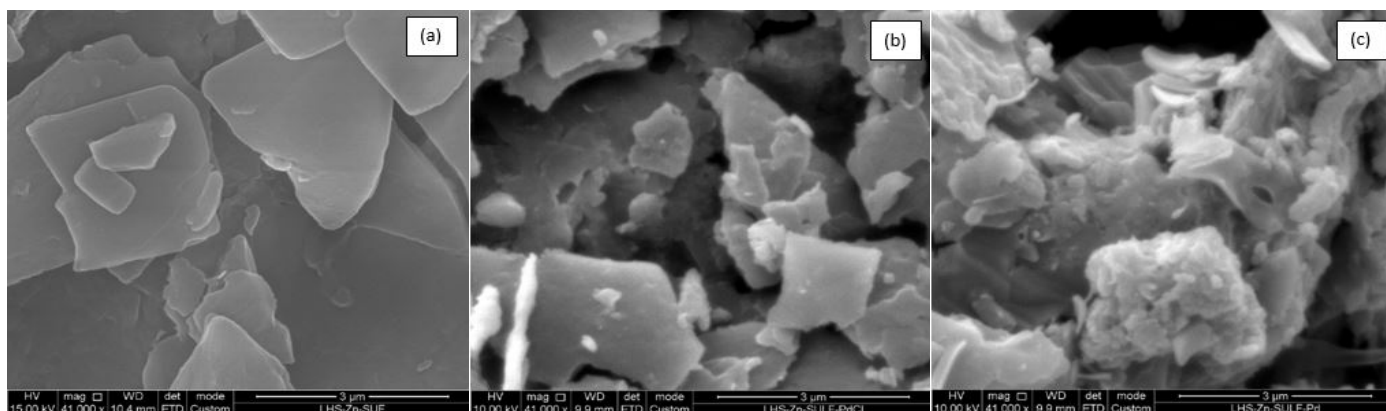


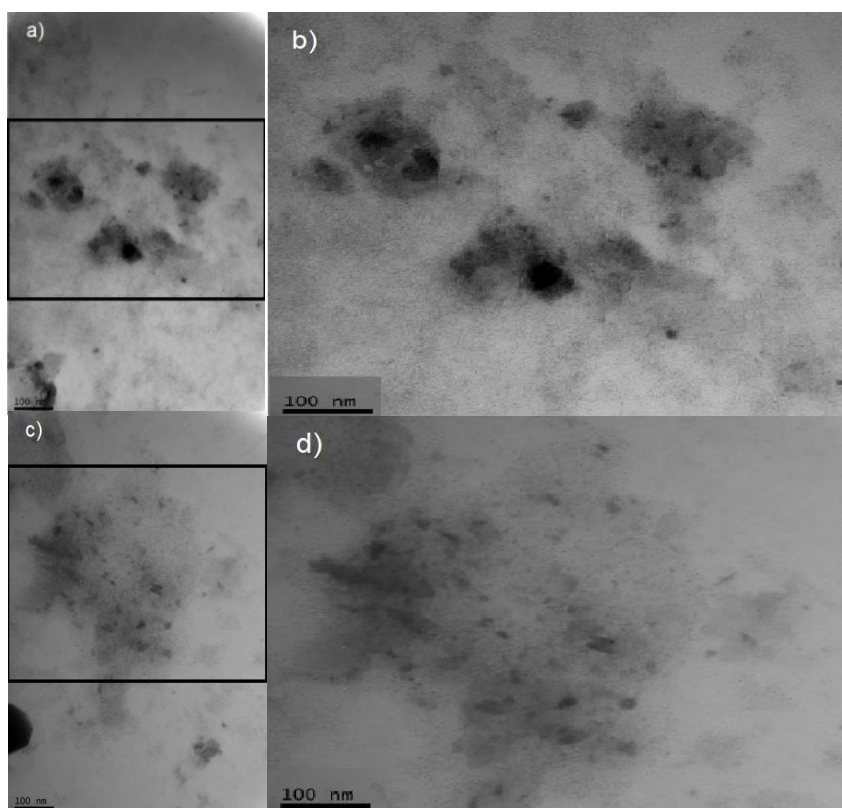
Figura 7. Imágenes de SEM a 41000 x de hidroxisales con acetato a) LHS-Zn-Ac, b) LHS-Zn-Ac/[PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> y c) LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup>



**Figura 8.** Imágenes de SEM a 41000 x de hidroxisales con surfactante a) LHS-Zn-Suf, b) LHS-Zn-Suf/[PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> y c) LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup>

La formación de nanopartículas de paladio soportadas en los materiales laminares en la reducción de los precursores que contienen [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> bajo reflujo en etanol, observadas en los difractogramas (Figuras 4c y 5c), se puede confirmar mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión, (TEM según su sigla en inglés), Figuras 9a y 9c. Las respectivas imágenes muestran las fotografías de las nanopartículas de paladio metálico con un tamaño menor de 10 nm, un valor similar al reportado en la literatura (30). Probablemente este tamaño también se deba a la aglomeración de muchas nanopartículas de paladio en algunas áreas, dado que adicionalmente se observan partículas mucho más pequeñas en otras áreas.

Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) de los materiales (a) LHS-Zn-Ac (b) LHS-Zn-Ac/[PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> y (c) LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> se muestran en la Figura 10, y los datos de cada señal se presentan en la Tabla 2. Además de las señales esperadas para enlace C-H (29, 31), se observa una banda ancha e intensa en la región de 3600-3000 cm<sup>-1</sup>, asignada a los modos vibracionales del grupo hidroxilo (OH) en el material inorgánico y de las moléculas de agua (31). Particularmente, en el espectro FT-IR del precursor LHS-Zn-Ac se observan tres bandas de absorción a 3396, 3482 y 3573 cm<sup>-1</sup>. Mediante espectroscopia Raman, estas señales se han atribuido a los grupos OH de las láminas inorgánicas de las posiciones octaédricas o tetraédricas de la hidroxisal (29).



**Figura 9.** Imágenes de TEM de los materiales sintetizados a) LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup>, b) aumento en el área marcada de (a), c) LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup> y d) aumento en el área marcada de (c)

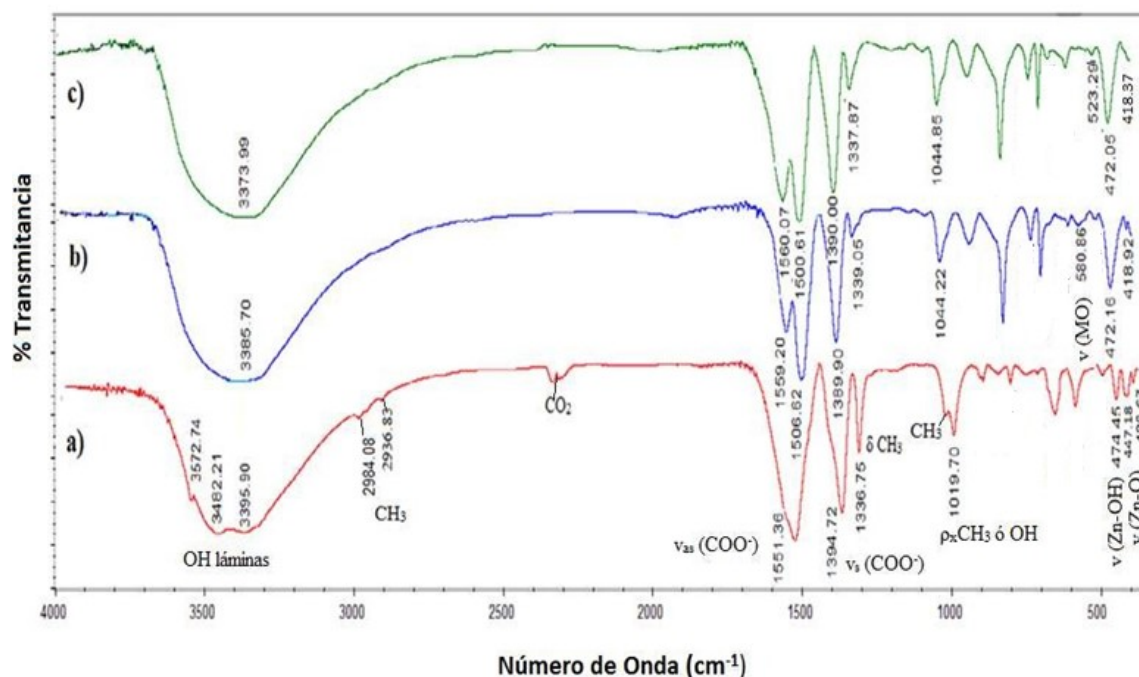


Figura 10. Espectros FT-IR de los materiales sintetizados (a) LHS-Zn-Ac (b) LHS-Zn-Ac/[PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>, (c) LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup>

Igualmente, en relación con lo reportado en la literatura (32, 33), se observan claramente en todos los materiales las señales correspondientes a la vibración asimétrica y simétrica del grupo carbonilo (1560 cm<sup>-1</sup> y 1430-1350 cm<sup>-1</sup> respectivamente). En el presente trabajo se observa una señal a 1394 cm<sup>-1</sup> para el LHS-Zn-Ac, pero de 1390 cm<sup>-1</sup> para el material intercambiado y reducido (LHS-Zn-Ac/[PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>, LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup>).

Tabla 2. Números de onda (cm<sup>-1</sup>) asignados a las bandas de vibración de las hidroxilas con acetato

Grupos funcionales	LHS-Zn-Ac (cm <sup>-1</sup> )	LHS-Zn-Ac/[PdCl <sub>4</sub> ] <sup>2-</sup> (cm <sup>-1</sup> )	LHS-Zn-Ac/Pd <sup>0</sup> (cm <sup>-1</sup> )
OH	3600-3000	3600-3000	3600-3000
ν <sub>as</sub> CH <sub>3</sub>	2984	-	-
ν <sub>s</sub> CH <sub>3</sub>	2936	-	-
ν <sub>as</sub> COO <sup>-</sup>	1551	1560	1560
COO <sup>-</sup>	1394	1390	1390
CH <sub>3</sub>	1337	1339	1338
MO	-	581	-
ZnOH	474	472	472
ZnO	420	418	419

Biswick y colaboradores (31) reportan que la naturaleza y grado de interacción del ion acetato con la matriz catiónica puede ser inferida de la diferencia de energía (Δν) de las vibraciones de tensión asimétricas y simétricas del ion carboxilato como se muestra en la Tabla 3. De acuerdo al (Δν) calculado en los tres materiales, es posible afirmar que el modo de coordinación del ion carboxilato al átomo de zinc es unidentado (31, 32, 34).

Tabla 3. Números de onda asignados a las bandas de vibración del grupo COO<sup>-</sup>

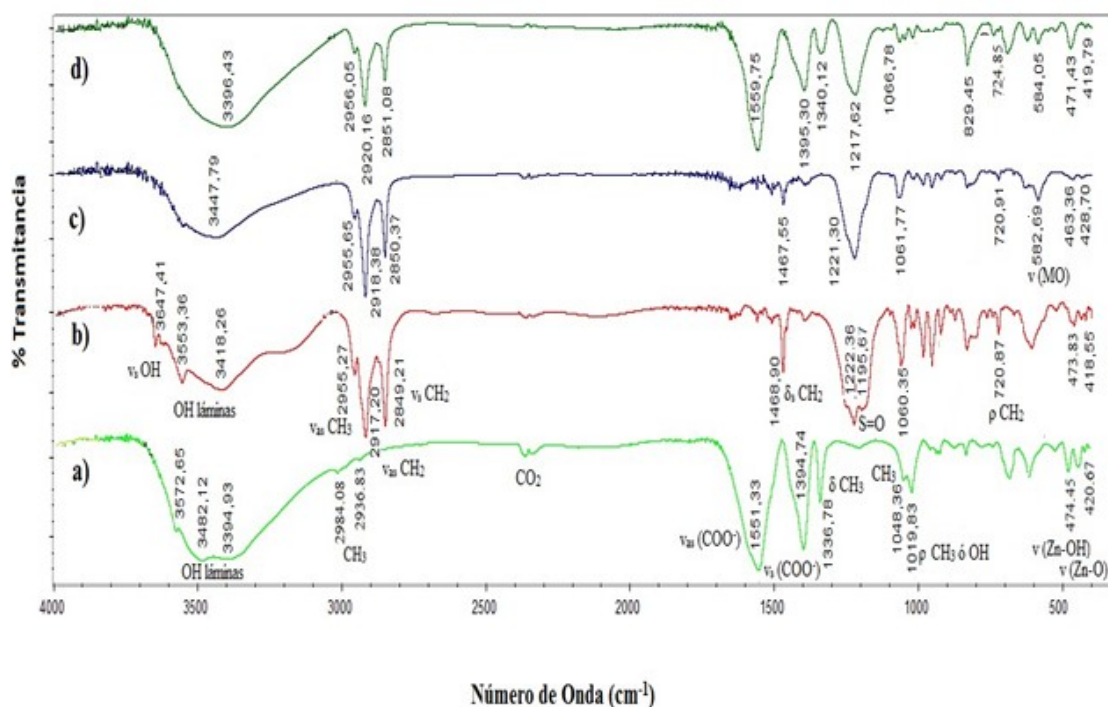
Material	ν asimétrica (cm <sup>-1</sup> )	ν simétrica (cm <sup>-1</sup> )	Δν (cm <sup>-1</sup> )	Modo de coordinación
LHS-Zn-Ac	1552	1395	157	Unidentado
LHS-Zn-Ac/[PdCl <sub>4</sub> ] <sup>2-</sup>	1559	1390	169	Unidentado
LHS-Zn-Ac/Pd <sup>0</sup>	1560	1390	170	Unidentado

Las vibraciones características del ion acetato disminuyen en el material LHS-Zn-Ac/[PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>, por la inserción del ion [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> en el espacio interlamilar, que se confirma por la aparición de una banda a 581 cm<sup>-1</sup>, atribuible a una vibración tipo metal-oxígeno como lo reporta la literatura (35). En el material reducido LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> la última vibración no se observa en el espectro FT-IR (Figura 10c) posiblemente porque el paladio ya no se encuentra coordinado.

Por su parte, en los materiales con surfactante LHS-Zn-Suf, LHS-Zn-Suf/[PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>, LHSZn-Suf/Pd<sup>0</sup>, las señales FT-IR (Figura 11) son las mismas con respecto a los materiales análogos con acetato (Figura 10), excepto por las siguientes señales: 3647 cm<sup>-1</sup>, 2920 cm<sup>-1</sup>, 2850 cm<sup>-1</sup> y 1120 cm<sup>-1</sup>. Estas señales corresponden a vibraciones de tensión del OH del agua (37), vibración asimétrica y simétrica del grupo CH<sub>2</sub> y a la vibración de enlaces S=O, respectivamente, que se originan por la presencia de moléculas de surfactante (Tabla 4). Igual que en los materiales con acetato se observa la misma tendencia a exhibir la señal a 581 cm<sup>-1</sup> que evidencia la inserción del ion [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>, pero en estos materiales la señal no desapareció del todo después de la reacción de reducción, sugiriendo que no se llevó a cabo una reducción completa de paladio. Una relación más detallada y comparativa de las diferentes señales exhibidas por todos los materiales estudiados y su respectiva asignación se presenta en la Tabla 4. Estos valores son muy similares a los reportados por Menezes al utilizar laurilsulfato y mostrar una señal a 1222 cm<sup>-1</sup> (38, 39). Las señales por debajo de 900 cm<sup>-1</sup> son vibraciones de la estructura laminar que involucran el catión metálico como vibraciones Zn-O y Zn-OH (36).

**Tabla 4.** Números de onda (cm<sup>-1</sup>) asignados a las bandas de vibración de las hidroxisales con surfactante

Grupos funcionales	LHS-Zn-Ac (cm <sup>-1</sup> )	LHS-Zn-Suf (cm <sup>-1</sup> )	LHS-Zn-Suf/[PdCl <sub>4</sub> ] <sup>2-</sup> (cm <sup>-1</sup> )	LHS-Zn-Suf/Pd <sup>0</sup> (cm <sup>-1</sup> )
OH	3600-3000	3650-3000	3650-3000	3650-3000
$\nu_{as}CH_3$	2984	2955	2956	2956
$\nu_sCH_3$	2936	-	-	-
$\nu_{as}CH_2$	-	2917	2918	2920
$\nu_sCH_2$	-	2849	2850	2851
$\nu_{as}COO^-$	1551	-	-	1560
$\nu_sCOO^-$	1394	-	-	1395
CH <sub>3</sub>	1337	-	-	1338
CH <sub>2</sub>	-	1468	1467	-
S=O	-	1222	1221	1217
MO	-	-	583	584
ZnOH	474	474	463	471
ZnO	420	418	429	420



**Figura 11.** Espectros FT-IR de los materiales (a) LHS-Zn-Ac, (b) LHS-Zn-Suf, (c) LHSZn-Suf/[PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>, (d) LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup>

## Reacción de Sonogashira

Después de caracterizar los materiales inorgánicos, se comparó la reactividad de cada uno de estos en la reacción de acoplamiento Sonogashira entre un haluro de arilo y un acetileno terminal. Primero se experimentó con la reacción de Sonogashira clásica entre yodobenceno y fenilacetileno de acuerdo a lo reportado en la literatura (39). Luego a partir de estas condiciones se sintetizó 2-fenilbenzofurano.

## Síntesis de difenilacetileno

La Figura 12 muestra la síntesis de difenilacetileno utilizando los dos catalizadores; ambas reacciones conducen al mismo producto cuando se realiza con y sin CuI.

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos al realizar la síntesis de difenilacetileno con y sin CuI utilizando como base KOAc y 2 mL de DMF como solvente durante 45 min. Al mismo tiempo se tomó la precaución de utilizar atmósfera de nitrógeno y una menor cantidad de fenilacetileno con el fin de evitar el producto de homoacoplamiento en la reacción.

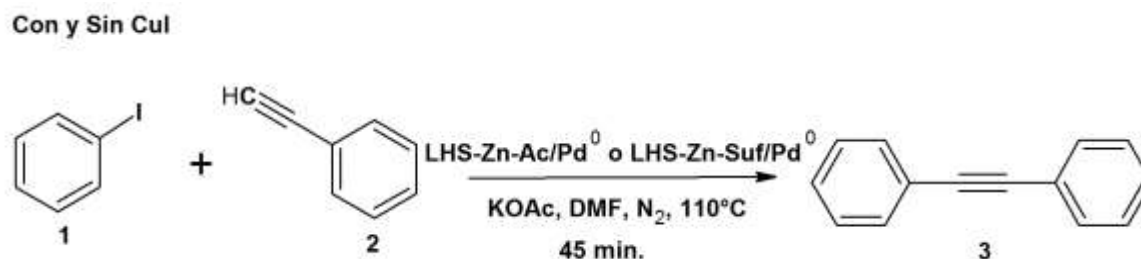


Figura 12. Síntesis de difenilacetileno con y sin CuI LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> y LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup>

Tabla 5. Rendimientos en la síntesis de difenilacetileno

Experimento	Reactivo 1 (mmol)	Reactivo 2 (mmol)	Base KOAc (mmol)	Catalizador (mg)	Co-catalizador (mg)	% Rendimiento
1	1,0	1,1	1,5	LHS-Zn-Ac/Pd 51	CuI 16,3	32
2	1,0	1,1	1,5	LHS-Zn-Suf/Pd 50	CuI 16,6	30
3	1,0	1,1	1,5	LHS-Zn-Ac/Pd 51		30
4	1,0	1,1	1,5	LHS-Zn-Suf/Pd 50		28

Los rendimientos obtenidos en la síntesis del difenilacetileno se encuentran alrededor de 32-30% cuando se realizan con CuI como co-catalizador. Sin co-catalizador, los rendimientos son del 30-28% disminuyendo 2%. Estos rendimientos fueron medidos por pesaje directo del producto aislado y purificado por cromatografía de columna. En general, siempre se observó una pequeña diferencia en los rendimientos de las reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> y LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup>, siendo un poco superiores con el primer material. Dado que el ambiente interlaminar en el material modificado con surfactante es altamente lipofílico, se afectan levemente las interacciones con los sustratos de polaridad intermedia o alta (yodobenceno y yodofenol) lo que presumiblemente podría explicar la reactividad ligeramente menor con el uso de LHS-Suf-Pd<sup>0</sup>.

#### Síntesis de 2-fenilbenzofurano

Varios autores han reportado la reacción de Sonogashira libre de CuI como cocatalizador (39). Con el fin de establecer las mejores condiciones de reacción, se realizó una comparación en la síntesis de 2-fenilbenzofurano a partir de 2-yodofenol y fenilacetileno (Figura 13), donde se establecieron las mismas condiciones para todos los experimentos como lo muestra la Tabla 6; las síntesis de 2-fenilbenzofurano se llevaron a cabo sin co-catalizador.

La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos al realizar la reacción con y sin co-catalizador CuI. Se observa que la diferencia entre los catalizadores cuando se realiza con CuI es solo del 1%, mientras que sin éste la diferencia fue del 4%. Los rendimientos en la síntesis de 2-fenilbenzofurano están alrededor de 17-18% cuando se emplea CuI, mientras sin utilizar co-catalizador los rendimientos se encuentran entre el 11-15% mostrando mayores rendimientos en ambos casos con el catalizador de acetato. Por otra parte es importante notar que el incremento de los rendimientos cuando se utiliza CuI es poco significativo (2 y 3%) frente a las complicaciones de la reacción cuando se utiliza CuI como cocatalizador.

Cada uno de los experimentos se siguió por TLC y GC-MS mostrando la presencia de 2-yodofenol en el crudo de reacción. Algunos autores plantean que al aumentar la sustitución del anillo aromático con grupos electrodonadores como el caso de 2-yodofenol, la reactividad del acoplamiento Sonogashira disminuye (40), lo cual justifica la presencia de 2-yodofenol cuando se consume el exceso de fenilacetileno, explicando los bajos rendimientos obtenidos hasta el momento.

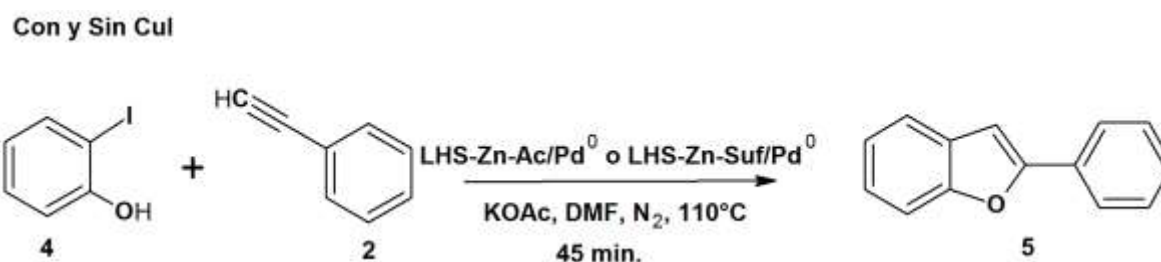


Figura 13. Síntesis de 2-fenilbenzofurano con y sin CuI (LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> y LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup>)

Tabla 6. Rendimientos en la síntesis de 2-fenilbenzofurano

Experimento	Reactivo 1 (mmol)	Reactivo 2 (mmol)	Base KOAc (mmol)	Catalizador (mg)	Co-catalizador (mg)	% Rendimiento
1	1,0	1,25	1,5	LHS-Zn-Ac/Pd 50,5	CuI 16,5	18
2	1,0	1,25	1,5	LHS-Zn-Suf/Pd 51,1	CuI 16,3	17
3	1,0	1,25	1,5	LHS-Zn-Ac/Pd 50,5		15
4	1,0	1,25	1,5	LHS-Zn-Suf/Pd 51,1		11

Finalmente es importante volver a mencionar que una estimación cualitativa del contenido de paladio metálico contenido en las hidroxisales LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> y LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup> se deriva de los resultados del estudio por SEM, que muestra contenidos aproximados del 16% de paladio reducido en LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> y 31% en LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup>, datos tomados en los puntos de mayor aglomeración de partículas metálicas. Sin embargo, estos resultados son solo una guía preliminar, entre otras razones porque los materiales son de naturaleza heterogénea y la metodología del análisis SEM permite censar regiones a criterio del analista. En esta circunstancia, los porcentajes suministrados no reflejan necesariamente el contenido cuantitativo de paladio en la totalidad del material y no se espera que haya estricta concordancia entre el contenido aparente de paladio y la actividad catalítica.

## Conclusiones

Se logró la síntesis de dos nuevos materiales con nanopartículas de paladio aglomeradas y soportadas en las láminas: LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> y LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup> lo cual se verificó por TEM. El análisis por XRD de ambos materiales evidenció las estructuras laminares de acuerdo a los planos de difracción y modificaciones en el espacio interlaminar. Así, el material LHS-Zn-Ac mostró una distancia interlaminar de 13,8 Å. Cuando se realizó el intercambio con el anión laurilsulfato (LHS-Zn-Suf) aumentó el espacio interlaminar hasta 29,8 Å y, al intercambiarse con [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> (LHS-Zn-Suf/[PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>), aumentó a 31,4 Å. Finalmente, una vez se redujo este material y se preparó LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup> se observó una interlámina con una distancia de 29,4 Å.

Con respecto al intercambio del LHS-Zn-Ac con [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> (LHS-Zn-Ac/[PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>), se evidenció un cambio en el espacio interlaminar de 13,8 Å a 22,4 Å, el cual se mantuvo al hacer la reducción (LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup>). Lo anterior se debe posiblemente a la falta de reducción total del [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> o la presencia de nanopartículas con un tamaño inferior a 2 nm en la interlámina.

Adicionalmente, mediante la técnica de SEM se mostró la morfología laminar de cada uno de los materiales. Además, se observaron leves cambios como la exfoliación o delaminación de los dos materiales reducidos usando etanol en reflujo. Cada uno de los materiales laminares sintetizados mostró actividad catalítica en la síntesis de difenilacetileno y 2-fenilbenzofurano.

Cuando se utilizó LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> y CuI (como co-catalizador) se obtuvieron rendimientos del 32% de difenilacetileno y 18% de 2-fenilbenzofurano, mientras que con LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup> y CuI los rendimientos obtenidos fueron del 30% y 17% respectivamente.

En ausencia de CuI, los rendimientos fueron menores (30% de difenilacetileno y 15% 2-fenilbenzofurano con LHS-Zn-Ac/Pd<sup>0</sup> y 28% y 11% respectivamente con LHS-Zn-Suf/Pd<sup>0</sup>).

## Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados de la Universidad de Caldas por la financiación del proyecto (código 1595413) y al programa de Jóvenes Investigadores-Colciencias.

## Referencias

- Giraldo, O.; Brock, S. L.; Willis, W. S.; Marquez, M.; Suib, S. L.; Ching, S. Manganese Oxide Thin Films with Fast Ion-Exchange Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (38), 9330–9331. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja001860i>.
- Ogawa, M.; Kaiho, H. Homogeneous Precipitation of Uniform Hydrotalcite Particles *Langmuir*. **2002**, *18* (11), 4240–4242. DOI: <https://doi.org/10.1021/la0117045>.
- Morioka, H.; Tagaya, H.; Karasu, M.; Kadokawa, J.; Chiba, K. Effects of Zinc on the New Preparation Method of Hydroxy Double Salts. *Inorg. Chem.* **1999**, *38* (19), 4211–4216. DOI: <https://doi.org/10.1021/ic9812149>.
- Kandare, E.; Hossenlopp, J. M. Hydroxy double salt anion exchange kinetics: effects of precursor structure and anion size. *J. Phys. Chem.* **2005**, *109* (17), 8469–8475. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp0465433>.
- Cavani, A. F.; Trifiró, F. Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. *Catal. Today*. **1991**, *11*, 173–301.
- Arizaga, G.; Satyanarayana, K.; Wypych, F. Layered hydroxide salts: Synthesis, properties and potential applications. *Solid State Ionics*. **2007**, *178*, 1143–1162. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ssi.2007.04.016>.
- Crepaldi, E. L.; Pavan, P. C.; Valim, J. B. Anion exchange in layered double hydroxides by surfactant salt formation. *J. Mater. Chem.* **2000**, *10* (6), 1337–1343. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.04.073>.
- Polshettiwar, V.; Hesemann, P.; Moreau, J. J. Palladium containing nanostructured silica functionalized with pyridine sites: a versatile heterogeneous catalyst for Heck, Sonogashira, and cyanation reactions. *Tetrahedron*. **2007**, *63* (29), 6784–6790. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.04.073>.

9. Demel J.; Hynek J.; Kovar P.; Dai, Y.; Taviot-Guého C.; Demel O. *et al.* Insight into the Structure of Layered Zinc Hydroxide Salts Intercalated with Dodecyl Sulfate Anions. *J. Phys. Chem. C*. **2014**, *118*, 27131–27141. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp508499g>.
10. Rojas, D. R. Hidroxisales de Ni y Zn: Propiedades de Intercambio y productos de descomposición. Tesis Doctoral [En línea] Departamento de Química Inorgánica e ingeniería Química, Universidad de Córdoba Argentina, 2005. [https://www.researchgate.net/publication/232722540\\_Hidroxisales\\_de\\_Ni\\_y\\_Zn\\_Propiedades\\_de\\_intercambio\\_y\\_productos\\_de\\_descomposicion](https://www.researchgate.net/publication/232722540_Hidroxisales_de_Ni_y_Zn_Propiedades_de_intercambio_y_productos_de_descomposicion). (Consultado el 12 de noviembre de 2014).
11. Lin, B. N.; Huang, S. H.; Wu, W.Y.; Mou, C.Y.; Tsai, F.Y. Sonogashira reaction of aryl and heteroaryl halides with terminal alkynes catalyzed by a highly efficient and recyclable nanosized MCM-41 anchored palladium bipyridyl complex. *Molecules* **2010**, *15* (12), 9157–73. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules15129157>.
12. Saha, D.; Dey, R.; Ranu, B. C. A Simple and Efficient One-Pot Synthesis of Substituted Benzo[b]furans by Sonogashira Coupling-5-endo-dig Cyclization Catalyzed by Palladium Nanoparticles in Water Under Ligand- and Copper-Free Aerobic Conditions. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *31*, 6067–6071. DOI: <https://doi.org/10.1002/ejoc.201000980>.
13. Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes, and bromopyridines. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *50*, 4467–4470. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(00\)91094-3](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(00)91094-3).
14. Choudary, B. M.; Madhi, S.; Chowdari, N. S.; Kantam, M. L.; Sreedhar, B. Layered Double Hydroxide Supported Nanopalladium Catalyst for Heck-, Suzuki-, Sonogashira-, and Stille-Type Coupling Reactions of Chloroarenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (47), 14127–14136. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja026975w>.
15. Novák, Z.; Timári, G.; Kotschy, A. The first total synthesis of Cicerfuran utilizing a one-pot synthesis of hydroxylated benzofurans. *Tetrahedron* **2003**, *59* (38), 7509–7513. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)01170-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)01170-0).
16. Csékei, M.; Novák, Z.; Kotschy, A. Development of a one-pot sequential Sonogashira coupling for the synthesis of benzofurans. *Tetrahedron* **2008**, *64* (37), 8992–8996. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.05.100>.
17. Huc V.; Pelzer, K. A new specifically designed calix[8]arene for the synthesis of functionalized, nanometric and subnanometric Pd, Pt and Ru nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *318* (1), 1–4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.07.083>.
18. Stevens, P. D.; Li, G.; Fan, J.; Yen, M.; Gao, Y. Recycling of homogeneous Pd catalysts using superparamagnetic nanoparticles as novel soluble supports for Suzuki, Heck, and Sonogashira cross-coupling reactions. *Chem. Commun.* **2005**, *35*, 4435–4437. DOI: <https://doi.org/10.1039/b505424a>.
19. Phan, N. T. S.; Gill, C. S.; Nguyen, J. V.; Zhang, Z. J.; Jones, C. W. Expanding the utility of one-pot multistep reaction networks through compartmentation and recovery of the catalyst. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2006**, *45* (14), 2209–2212. DOI: <https://doi.org/10.1002/ange.200503445>.
20. Shiyong, L.; Qizhong, Z.; Zhengneng, J.; Huajiang, J.; Xuanzhen, J. Dodecylsulfate Anion Embedded Layered Double Hydroxide Supported Nanopalladium Catalyst for the Suzuki Reaction. *Chin. J. Catal.* **2010**, *31* (5), 557–561. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(09\)60072-3](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(09)60072-3).
21. Martínez, M.; Ocampo, R.; Ríos, L. A. Palladium nanoparticles supported on layered hydroxide salts and their use in carbon-carbon coupling organic reactions. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22* (12), 2322–2329. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011001200012>.
22. Rajamathi, J. T.; Ahmed, M. F.; Ravishankar, N.; Nethravathi, C.; Rajamathi, M. Anionic clay-Pt metal nanoparticle composite through intercalation of hexachloroplatinate in nickel zinc hydroxysalt. *Solid State Sci.* **2009**, *11* (7), 1270–1274. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2009.03.020>.
23. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 21 ed., New York, 2005. (Citado por IDEAM Colombia Código: TP0151, versión 2, fecha de elaboración: 31/08/2007).
24. Kopka, H.; Beneke, K.; Lagaly, G. Anionic Surfactants between Double Metal Hydroxide Layers. *J. Colloid Interface Sci.* **1988**, *123* (2), 427–436. DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(88\)90263-9](https://doi.org/10.1016/0021-9797(88)90263-9).
25. Wang, Y.; Li, F.; Dong, S.; Liu, X.; Li, M. A facile approach for synthesizing Fe-based layered double hydroxides with high purity and its exfoliation. *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *467*, 28–34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.12.058>.
26. Ma, R.; Liu, Z.; Takada, K.; Iyi, N. Synthesis and exfoliation of Co<sup>2+</sup>-Fe<sup>3+</sup> layered double hydroxides: An innovative topochemical approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (16), 5257–5263. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja0693035>.
27. Patel, K.; Kapoor, S.; Dave, D. P.; Mukherjee, T. Synthesis of Pt, Pd, Pt/Ag and Pd/Ag nanoparticles by microwave-polyol method. *J. Chem. Sci.* **2005**, *117*, 4, 311–316. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02708443>.
28. Liu, Z.; Ma, R.; Osada, M.; Iyi, N.; Ebina, Y.; Takada, K. et al. Synthesis, Anion Exchange, and Delamination of Co-Al Layered Double Hydroxide: Assembly of the Exfoliated Nanosheet/Polyanion Composite Films and Magneto-Optical Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (14), 4872–4880. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja0584471>.
29. Martínez G. M. M. Hidroxisales de zinc como soporte de nanopartículas de paladio y su aplicación en reacciones de acoplamiento carbono-carbono. Tesis de Maestría. Departamento de Química, Universidad de Caldas, 2010.
30. Papp, S.; Szűcs, A.; Dekany, I. Preparation of Pd0 nanoparticles stabilized by polymers and layered silicate. *Appl. Clay Sci.* **2001**, *19* (1-6), 155–172. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-1317\(01\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0169-1317(01)00048-5).
31. Biswick, T.; Jones, W.; Pacula, A.; Serwicka, E.; Podobinski, J. Evidence for the formation of anhydrous zinc acetate and acetic anhydride during the thermal degradation of zinc hydroxy acetate, Zn<sub>5</sub>(OH)<sub>8</sub>(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O to ZnO. *Solid State Sci.* **2009**, *11* (2), 330–335. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2008.06.018>.

32. Ballesteros, M. A.; Ulibarri, M. A.; Rives, V.; Barriga, C. Optimum conditions for intercalation of lacunary tungstophosphate (V) anions into layered Ni(II)-Zn(II) hydroxyacetate. *J. Solid State Chem.* **2008**, *181* (11), 3086–3094. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2008.07.037>.
33. Arulraj J.; Rajamathi, M. Preparation of anionic clay-birnessite manganese oxide composites by interlayer oxidation of oxalate ions by permanganate. *J. Solid State Chem.* **2013**, *198*, 303–307. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2012.10.014>.
34. Choy, J.-H.; Kwon, Y.-M.; Song, S.-W.; Chang, S. H. Structural Phase Transformation of Layered Hydroxy Double Salts,  $\text{Ni}_{1-x}\text{Zn}_x(\text{OH})_2(\text{CH}_3\text{COO})_{2x} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , Depending on Hydration Degree. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1997**, *18* (4), 450–453.
35. Nakamoto, K. *Applications in Coordination Chemistry, in Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, 6th ed. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2008, p 424. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470405888.ch1>
36. Hussein, M. Z. B.; Ghotbi, M. Y.; Yahaya, A. H.; Rahman, M. Z. Synthesis and characterization of (zinc-layered-gallate) nanohybrid using structural memory effect. *Mater. Chem. Phys.* **2009**, *113* (1), 491–496. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2008.07.127>.
37. Taibi, M.; Ammar, S.; Jouini, N.; Fiévet, F.; Molinié, P.; Drillon, M. Layered nickel hydroxide salts: synthesis, characterization and magnetic behaviour in relation to the basal spacing. *J. Mater. Chem.* **2002**, *12* (11), 3238–3244. DOI: <https://doi.org/10.1039/B204087E>.
38. Menezes P.; Nityashree, N. a . Mg/Al layered double hydroxide-Pt nanoparticle composite by delamination-restacking route. *Appl. Nanosci.* **2002**, *3* (4), 321–327. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13204-012-0137-1>. b. Nityashree and Rajamathi. Interstratified Composite of the Anionic Clays,  $\text{Zn}_5(\text{OH})_8(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Ni}_3\text{Zn}_2(\text{OH})_8(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , by Delamination-Costacking. *J. Phys. Chem. Solids.* **2013**, *75*, (8), 1164–1168. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2013.03.015>.
39. Khazaei, A.; Rahmati, S.; Saednia, S. An efficient ligand- and copper-free Sonogashira reaction catalyzed by palladium nanoparticles supported on pectin. *Catal. Commun.* **2013**, *37*, 9–13. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13204-012-0137-1>.
40. Bhattacharya S.; Sengupta, S. Palladium catalyzed alkynylation of aryl halides (Sonogashira reaction) in water. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, (47), 8733–8736. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.09.131>.

**Article citation:**

Giraldo-Londoño, C. C.; Ocampo-Cardona, R.; Ríos-Vásquez, L. A.; Martínez-Garzón, M. M.; Aguirre-Cortés, J. M. Nanopartículas de paladio soportadas en hidroxisales laminares: uso potencial en reacciones de Sonogashira *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, *46* (2), 51-65. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.62988>

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 de 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 **ÚNICAMENTE** a través de la plataforma en línea Open Journal System (OJS) de la Revista (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim>). Se recomienda a los autores la publicación de artículos en inglés, pues esto contribuye a la visualización y citación internacional del artículo y de la Revista.

## Requisitos generales de envío

1. 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, de lo contrario se devolverán sin ser evaluados (Ver sección Preparación para el envío online).

2. Debe adjuntarse una carta de presentación del artículo, donde se incluyan los aspectos más relevantes del artículo y una lista de cuatro posibles evaluadores que sean externos tanto a la institución del autor como a la Universidad Nacional de Colombia, incluyendo todas sus sedes, con sus respectivos datos de contacto. Esta carta de presentación debe estar firmada por todos los autores (Ver formato carta autoría en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/downloadSuppFile/10124/20981>).

3. La versión del documento en línea no debe incluir ningún dato de autoría ni filiación institucional, con el fin de garantizar una revisión por pares anónima. Estos datos se incluyen en el formulario de envío a través del portal y también deben adjuntarse en un documento adicional (se carga como archivo complementario).

4. Tanto las figuras como las tablas deben aparecer en el documento en el orden correspondiente para facilitar el proceso de revisión. Sin embargo, dado que Word baja la resolución de las imágenes, es necesario que también las adjunte en un archivo aparte, en formato TIFF o JPEG al tamaño en que van a salir, con 300 dpi de resolución. 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.

## 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** (opcional) y **Referencias**.

## Idioma

Los manuscritos se aceptan en español o inglés. Sin embargo, siempre el **título**, **resumen** y **palabras claves** deben presentarse en los tres idiomas (incluyendo portugués). 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 Acelas<sup>1</sup>, Elizabeth Gil<sup>2</sup>, Markus Doerr<sup>3</sup>, Martha Daza<sup>3</sup>, Juan Manuel Urbinal\*

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

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

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

\* Autor para correspondencia: [jurbina@uis.edu.co](mailto:jurbina@uis.edu.co)

## Cuerpo del artículo

Todo el texto debe venir justificado (alineado a izquierda y derecha), con las páginas numeradas continuamente. Todos los títulos y subtítulos primarios y secundarios deben ir justificados a la izquierda. Para los títulos (**Resumen**, **Palabras clave**, **Abstract**, **Keyword**, **Resumo**, **Palavras-Chave**, **Introducción**, **Materiales y métodos**, **Resultados y discusión**, **Agradecimientos**, **Conclusiones** y **Referencias**) la primer letra va en mayúscula y las demás deben ir en minúscula y negrilla. Los *subtítulos primarios* en minúsculas sostenida y en cursiva. Los **subtítulos secundarios** con minúscula sostenida y en negrilla.

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.

## 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. 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 ([www.crossref.org](http://www.crossref.org)).

- 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.

#### Tesis doctoral (o similar)

- 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 tablas deben estar en el cuerpo del artículo, en el orden de aparición correspondiente. 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. Las fotos, diagramas, mapas y gráficas se clasifican como figuras. Evite redundancia entre tablas, figuras y texto.

- Además de relacionar las figuras y las tablas en el cuerpo del artículo, estas deben adjuntarse con sus respectivas leyendas individualmente en formato .TIFF de excelente calidad, con una resolución mínima de 300 dpi. 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.

- 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.

## 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\_fcbog@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.

Manuscripts sent to the Revista Colombiana de Química (Colombian Journal of Chemistry) for possible publication must be original (not submitted at the same time to any other printed or digital journal). Authors are responsible for the opinions and ideas stated in the manuscript. The accuracy of the information in the manuscripts, including figures and tables, is the complete responsibility of the author or the authors. The manuscripts will be received **ONLY** through the Journal's Open Journal System (OJS) platform (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim>). The authors are recommended to publish articles in English, as this contributes to the international viewing and citation of the article and the Journal.

## General submission requirements

1. The author must be registered in the website, otherwise it should register according to the necessary steps. Before starting, it is important that you verify that your submission complies scrupulously with all the requirements requested by the journal, otherwise they will be returned without being evaluated (See section Preparing for online submission).

2. A letter of presentation of the article should be attached, including the most relevant aspects of the article and a list of four possible evaluators that are external to both the institution of the author and the Universidad Nacional de Colombia (National University of Colombia), including all its branches, with Their respective contact details. This cover letter must be signed by all authors (See format letter authorship in: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/downloadSuppFile/10124/20981>).

3. The version of the online document should not include any data of authorship or institutional affiliation, in order to guarantee an anonymous peer review. These data are included in the submission form through the website and must also be attached in an additional document (it is uploaded as a supplementary file).

4. Both figures and tables should appear in the document in the appropriate order to facilitate the review process. However, since Word lowers the resolution of the images, it is necessary to also attach them in a separate file, in TIFF or JPEG format to the size at which they will be output, with 300 dpi resolution. If the graphics correspond to files worked in Excel or Word should be sent in such programs, but open, not as an image so that they can be edited.

## Format

The document must be presented in Word file .doc or .docx, letter size, line spacing 2.0, with upper and lower margins of 2.5 cm and 3.0 cm on the sides, with Times New Roman 12, numbered pages From start to finish. The titles: **Resumen, Abstract, Resumo, Introduction, Materials and methods, Results and discussion, Conclusions, Acknowledgments** (optional) and **References** should be used.

## Language

Manuscripts are accepted in Spanish or English. However, the title, abstract and keywords should always be presented in all three languages (Spanish, English and Portuguese). As a strategy to increase the diffusion and visibility of the results it is suggested to present the manuscripts in English.

## Main Page

### Title

The title must be lowercase, unless the upper case is mandatory. It should be concise but informative and should not exceed 120 characters including spaces. It should always appear in Spanish, English and Portuguese. For example:

- 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.

## Author(s) and filiation

- Full names.
- Last professional title.
- Institution of work.
- Country and city of residence.
- Email (from each author).

In the filiation data, the categorical order must be kept: Laboratory, institute, university, city, state, country, e-mail. Each filiation must be listed with superscript numbers and referenced to each author. The correspondence author must be denoted with an asterisk. For example:

Mauricio Acelas<sup>1</sup>, Elizabeth Gil<sup>2</sup>, Markus Doerr<sup>3</sup>, Martha Daza<sup>3</sup>, Juan Manuel Urbina<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Organic and Biomolecular Chemistry - LQOBio, Faculty of Sciences, Industrial University of Santander, Ciudad Universitaria, AA 678, Bucaramanga, Colombia.

<sup>2</sup>Faculty of Sciences, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 N° 43-82, Bogotá D.C., Colombia.

<sup>3</sup>Group of Theoretical Biochemistry - GBQT, Faculty of Sciences, Industrial University of Santander, Ciudad Universitaria, AA 678, Bucaramanga, Colombia.

\*Author for correspondence: [jurbina@uis.edu.co](mailto:jurbina@uis.edu.co)

## Article body

All text should be justified (aligned left and right), with pages numbered continuously. All primary and secondary titles and subtitles must be justified to the left. For the titles (Abstract, Keywords, Abstract, Keyword, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and methods, Results and discussion, Acknowledgments, Conclusions and References) the first letter is capitalized and the others must be lowercase and bold. *Primary subtitles* sustained lowercase and italics. **Secondary subtitles** sustained and bold lowercase.

Statistical terms, abbreviations and symbols should always be defined the first time they are used in the article. For units of measurement the international metric system must be used. When not followed by units, integers up to ten are written with the word (one, two, ten) and greater than ten with numbers (11, 12, 102). When numbers are used, they must be followed by their units and a space between them (100 m, 50 mL). If it is a percentage do not leave space between the number and the unit (80%). In manuscripts written in Spanish the decimal numbers will be separated by commas (,) and in English by period (.). Cite each figure and table in the text according to the order of appearance and in the following format: Figure 1 or Figures 1 and 2 or Figures 1A-1F or Table 1.

## Abstract

Summary of maximum 200 words. It is suggested to introduce an introductory phrase. The purposes of the research, the relevant results (providing specific data and, if possible, their statistical significance) should be mentioned, and the main conclusions not including bibliographical citations. Emphasis should be placed on the new and important aspects of the study. A descriptive summary should be avoided (where no data are presented), instead, an analytical summary should be presented (the one in which the relevant data obtained in the research are presented). It should always appear in Spanish, English and Portuguese.

## Keywords

3 to 6 keywords should be listed. Words already used in the title of the manuscript should not be used. They should always appear in **Spanish, English and Portuguese**.

## Introduction

The grounds for the completion of the work must be presented. Only strictly relevant references are given and data or conclusions of the work being published should not be included. At the end of the introduction, the objective of the work must be presented.

## Materials and methods

In a subsection should be listed the reagents used, the brand and the country. Subtitles should be used in the procedures used. The procedures should be detailed enough to allow other professionals to replicate the research. The equipment used should be included, including the name of the manufacturer and country, as well as the references of the methodology and statistical methods. New or substantially modified methods should be described, supporting the reasons for using them and assessing their limitations.

Authors submitting review articles should describe the methods used to locate, select, extract and synthesize information. Whenever statistical testing is done, a subheading "*Statistical analysis*" should be used for its description.

## Results and Discussion

The results must be presented in a logical order and consistent with the order of the methods. The results that contribute to the generation of new knowledge should be highlighted. The information contained in tables should not be repeated in figures and vice versa.

The discussion should highlight the new and relevant aspects of the study, and avoid repeating information already provided in the **Introduction** section. It is recommended to evaluate possible relationships between the results obtained, to judge the results in relation to those obtained by other authors, and to propose hypotheses that explain the data obtained.

## Conclusions

A paragraph should appear with the conclusions, linked to the objectives of the study, avoiding to list them or to present them as single sentences. Assertions must be made fully supported by the data.

## Acknowledgments

The sources of funding of the research projects and/or supports received for the study (scholarships, equipment, reagents, among others) should be mentioned. Individuals who have lent their intellectual support to the work, but whose contributions do not justify the authorship, can be named, describing the contribution made, eg "technical support", "critical review of the writing", "collection of samples".

## References

The format is based on the American Chemical Society (ACS) style guide.

- **References in text:** All quotations that appear in the text must match those presented in the References section, and vice versa. Citations should be made with italic numbers in parentheses in the text line and within the punctuation mark. For example:

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

If there are multiple quotes they are separated by commas (,) with spaces between numbers; If they are consecutive citations, they are separated with hyphens (-). For example:

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

Citations should be written with natural numbers according to their order of appearance. If within the wording of the text should mention the author, then the citation should be:

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

• **Formato de referencias:** The references must be organized in the same numerical order in which they were presented throughout the text.

#### Journals

The surname and initials of the name of all authors should be noted. Surnames are separated from the initials of the comma name. The initials of the names of authors are accompanied by dot. Authors are separated by semicolons. Then the title is written. The abbreviated name of the journal in italics, according to the Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI, <http://cassi.cas.org/search.jsp>). The year is written in bold, the volume in italics and the pages (separated by dash). Similarly, if the article has DOI it is necessary to include it at the end of the reference ([www.crossref.org](http://www.crossref.org)).

- Up to six authors: all authors 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 up to the first six authors 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.

#### PhD 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, Marzo 1983.

- Electronic

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).

#### Websites

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/thermindex/> (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 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>

#### Tables and figures

- The tables should be in the body of the article, in the corresponding order of appearance. Both tables and figures must be self-contained (to be interpreted without having to resort to the body of the article). In the legend of the figure, or in the title or foot of the table, the keys, abbreviations and other explanations must be described. It is recommended to provide standard deviations and other statistical information relevant to the data in addition to the averages. Photos, diagrams, maps and graphs are classified as figures. Avoid redundancy between tables, figures and text.

- In addition to relating the figures and tables in the body of the article, they should be attached with their respective legends individually in excellent quality .TIFF format, with a minimum resolution of 300 dpi. Grayscale or weft should be used whenever possible. Color should be used when strictly necessary. Figures that have been created in Excel or Word must be sent in those programs.

- The labeling of each table should go above it, while in the figures must be presented at the bottom. Avoid Isolated Small Figures: Group figures with related information into compound letters labeled letters (Figure 1a, Figure 3b, etc.). If an article contains tables or figures reproduced (if they are from the same author), it is obligatory to declare the origin and to present permission to use them.

## Manuscript accepted for publication

If the editor has notified you that your manuscript could be accepted for publication if you take into account the modifications suggested by the reviewers, send the new version of the article accompanied by a letter detailing each of the reviewers' comments, and justify In case you do not consider any of the suggestions. Work on the new version of the article with change control or highlight the changes in this new version, so that the editor can easily identify them.

Once the peer review process has been completed, the editor will send an email to the author(s) of the manuscript stating the decision of the Editorial Committee. If the manuscript has been accepted for publication, the suggestions, indications and comments that each evaluator made on the substance and form aspects of the article will be attached to the mail. To continue with the publication process, the author(s) should send the following files to the Journal's e-mail (rcolquim\_fcbog@unal.edu.co):

- The new version of the document where you work with change control or highlight the modifications worked.
- A letter detailing each of the reviewers' comments, justifying those cases in which a particular indication or suggestion was not followed.
- Images that have been modified under the reviewers' comments and needs of the new version. Images must be in .TIFF format with a resolution greater than 300 dpi.

## Cost of publication

The publication of an article, with an extension not exceeding 3 printed pages of the journal, will cost \$30,000 Colombian pesos. The additional pages will cost \$20,000 Colombian pesos each.



## Contenido

Carta del editor  
Editor's letter

4

### Química Orgánica y Bioquímica

Condiciones para el análisis electroforético de proteínas apoplásticas de tallos y raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) para estudios proteómicos

Electrophoretic conditions for analysis of apoplastic proteins in stems and roots of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) for proteomic studies

Condições para a análise eletroforética de proteínas apoplásticas de caules e raízes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) para estudos proteômicos

Ana P. Martínez, Sixta T. Martínez, Harold D. Ardila

5-16

### Química Aplicada y Analítica

Evaluación del efecto protector contra la oxidación lipídica de fracciones obtenidas a partir del epicarpio de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Sendtn)

Evaluation of protective effect against lipid oxidation of fractions obtained from tree tomato (*Solanum betaceum* Sendtn) epicarp

Avaliação do efeito protetor contra oxidação lipídica de frações obtidas a partir da casca de tomate de árvore (*Solanum betaceum* Sendtn)

Henry I. Castro-Vargas, Fabián Parada-Alfonso

17-23

Desarrollo y validación de un método multiresiduo para el análisis de plaguicidas en miel por UFLC-MS

Development and validation of a multiresidue method for pesticide analysis in honey by UFLC-MS

Desenvolvimento e validação de um método de resíduos múltiplos para o análise de agrotóxicos em mel por UFLC-MS

Adriana M. Zamudio S., Nicolás Vanoy V., Consuelo Díaz-Moreno, Diego A. Ahumada F.

24-36

Metales pesados (Cd, Cu, V, Pb) en agua lluvia de la zona de mayor influencia de la mina de carbón en La Guajira, Colombia

Heavy metals (Cd, Cu, V, Pb) in rainwater in the most influence area of the coal mine in La Guajira, Colombia

Metais pesados Cd, Cu, V, Pb) na água de chuva na área de influência da mina de carvão em La Guajira, Colômbia

Carlos Doría Argumedo

37-44

Evaluación de métodos de extracción para la obtención del ácido giberélico en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.)

Comparison of different extraction methods for gibberelic acid obtention from corn (*Zea mays* L.) germinated seeds

Avaliação de diferentes metodologias de extração para a obtenção do ácido giberélico em sementes germinadas de milho (*Zea mays* L.)

Juan David Rivera, Yaned Milena Correa, Juan Pablo Penagos

45-50

### Fisicoquímica y Química Inorgánica

Nanopartículas de paladio soportadas en hidroxisales laminares: uso potencial en reacciones de Sonogashira

Palladium nanoparticles supported in laminar hydroxide salts: potential use in Sonogashira reactions

Nanopartículas de paládio suportadas em hidroxisais laminares: uso potencial em reacções de Sonogashira

Cristian Camilo Giraldo Londoño, Rogelio Ocampo-Cardona, Luz Amalia Ríos Vásquez, Maby Moll Martínez Garzón, Jhon Mauricio Aguirre Cortés

51-65

Guía para autores  
Guide for authors

66-73



La Revista Colombiana de Química (Rev.Colomb.Quim) se encuentra indexada y referenciada en: Pubindex-Índice Bibliográfico Nacional (categoría A2 - dic 2013); Chemical Abstracts; SciELO Colombia; Scopus Q4 (SJR/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 Acces Journal:** full contents available on-line at:

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

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