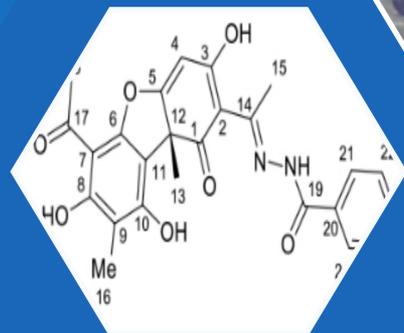
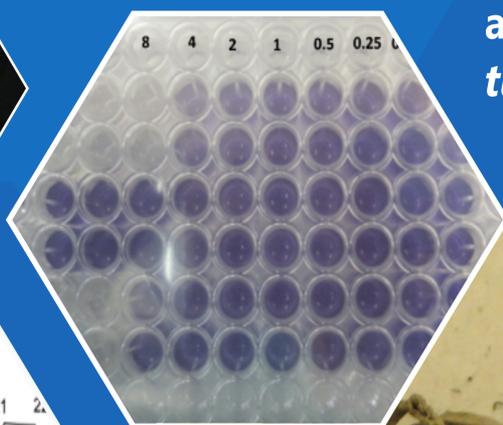
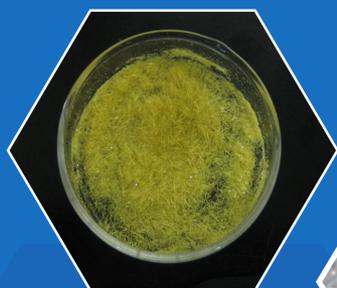


# R C Q

Volumen 46, nro. 3 de 2017/ ISSN 0120-2804

## Revista Colombiana de Química

Synthesis of acyl-hydrazone  
from usnic acid and isoniazid  
and its anti-*Mycobacterium  
tuberculosis* activity



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



# Revista Colombiana de Química

Volumen 46, No. 3, septiembre - diciembre 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 Narvárez 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
<hr/> <b>Química Orgánica y Bioquímica</b> <hr/>	
Diseño y producción de diversas proteínas fusión de la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT) de <i>Plasmodium falciparum</i> Design and production of various fusion proteins of the nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenilil transferase (NMNAT) of <i>Plasmodium falciparum</i> Desenho e produção de várias proteínas fusão da nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT) do <i>Plasmodium falciparum</i> <i>Carlos A. Nieto C., Nicolás Forero B., María H. Ramírez H.</i>	5-10
Composición fitoquímica del extracto de raíz de <i>Ichthyothere terminalis</i> de dos regiones geográficas de Colombia Phytochemical composition of the root <i>Ichthyothere terminalis</i> extract from two geographical regions in Colombia Composição fitoquímica do extracto de raíz de <i>Ichthyothere terminalis</i> de duas regiões geográficas da Colômbia <i>Luz Yineth Ortiz-Rojas, Giovanni Chaves-Bedoya</i>	11-16
Synthesis of acyl-hydrazone from usnic acid and isoniazid and its anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> activity Síntesis de acil-hidrazona a partir del ácido úsnico e isoniazida y su actividad anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Síntese de acilhidrazona a partir de ácido úsnico e isoniazida e sua atividade anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Melissa Barrera Tomas, Gloria Eva Tomas Chota, Patricia Sheen Cortavarria, Patricia Fuentes Bonilla, Miguel Angel Inocente Camones, Julio Santiago Contreras</i>	17-21
Alcaloides aporfínicos con actividad antituberculosa aislados de <i>Ocotea discolor</i> Kunth (Lauraceae) Aporphine alkaloids with antitubercular activity isolated from <i>Ocotea discolor</i> Kunth (Lauraceae) Alcalóides aporfínicos com atividade antituberculosa isolados de <i>Ocotea discolor</i> Kunth (Lauraceae) <i>Lady T. Albarracín, Oscar J. Patiño, Juan D. Guzman, Neelu Begum, Timothy D. McHugh, Luis E. Cuca, Mónica C. Ávila</i>	22-27
<hr/> <b>Química Aplicada y Analítica</b> <hr/>	
Nanopartículas de CuO y su propiedad antimicrobiana en cepas intrahospitalarias CuO nanoparticles and their antimicrobial activity against nosocomial strains Nanopartículas de CuO e sua propriedade antimicrobiana frente a cepas intrahospitalares <i>L. Esmeralda Román, Flavia Castro, Dora Maúrtua, Cesar Condori, Darwin Vivas, Ana E. Bianchi, Francisco Paraguay-Delgado, José L. Solís, Mónica M. Gómez</i>	28-36
Caracterización de filtros comerciales para agua a base de carbón activado para el tratamiento de agua del río Tumbes-Perú Characterization of water commercial filters based on activated carbon for water treatment of the Tumbes river-Peru Caracterização de carvão ativado de filtros comerciais para tratamento da água do rio Tumbes-Perú <i>Carmen R. Silupú, Rosa L. Solís, Gerardo J.F. Cruz, Mónica M. Gómez, José L. Solís, Riitta L. Keiski</i>	37-45
Guía para autores Guide for authors	46-53

El tercer número del volumen 46 del año 2017 de la Revista Colombiana de Química cuenta con la participación de distintos autores nacionales e internacionales. Las contribuciones provienen de autores de Perú, Reino Unido, Argentina, México y Finlandia; Bogotá, Cúcuta y Barranquilla (Colombia). A continuación se presenta el contenido del número.

La sección de Química Orgánica y Bioquímica cuenta con cuatro artículos. En el primero se estudió la solubilidad de la proteína recombinante nicotinamida/nicotinato mononucleótido adeniltransferasa de *Plasmodium falciparum* producida en distintos vectores de *E. coli*. Se encontró que agregar una etiqueta de proteína de unión a maltosa, permite obtener proteínas funcionales de alta pureza. En el segundo artículo de la sección se hace una identificación, por medio de cromatografía de gases, de los compuestos presentes en extractos etanólicos de raíz de *Ichthyothere terminalis* colectada en dos regiones de Colombia. Se encontró que hay diferencias en la composición, según el lugar de procedencia de las muestras. Así mismo, algunos de los compuestos encontrados podrían tener actividad repelente.

En el tercer artículo se aisló ácido úsnico del líquen *Evernia prunastri* colectado en Cajamarca-Perú. Seguidamente se sintetizó su derivado acil-hidrazona, con un rendimiento del 95%, por medio de una condensación con isonazida. Posteriormente se evaluó la actividad de ambos compuestos (ácido úsnico y derivado) contra diversas cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Se encontró que el compuesto sin natural tiene un mayor efecto antibiótico que el derivado. El cuarto artículo también estudia compuestos naturales con actividad antituberculosis, en este caso, cuatro alcaloides aislados de la Laurácea *Ocotea discolor* colectada en vía Duitama-Charalá (Colombia). Los alcaloides se caracterizaron mediante resonancia magnética nuclear, espectros de masas y comparación con bases de datos. Se encontró que todos los alcaloides estudiados presentaron un rango de concentración mínima inhibitoria de 140-310  $\mu\text{M}$ .

La sección de Química Aplicada y Analítica cuenta con dos artículos. En el primero de ellos se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de  $\text{CuO}$ . La síntesis se realizó a partir de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y la caracterización se hizo mediante XRD, FTIR, TEM y SEM. Seguidamente se estudió su actividad antimicrobiana sobre cuatro cepas intrahospitalarias colectadas en la Unidad de Cuidados Intensivos de un hospital de Lima. Se encontró que la inhibición de las cepas, medida como halos de inhibición, fue mayor para las nanopartículas sintetizadas a partir de sulfato, que para las sintetizadas a partir de acetato. Finalmente, en el último artículo se caracterizaron cuatro carbones activados presentes en filtros de agua comerciales para verificar que puedan purificar el agua del río Tumbes (Perú). Se determinaron la estructura y área superficial de los carbones, su capacidad para adsorber metales contaminantes (As y Pb) y así como su capacidad antimicrobiana contra tres bacterias fecales. Se encontró que los carbones son microporosos y mesoporosos, tienen áreas superficiales entre 705 y 906  $\text{m}^2/\text{g}$ , adsorben cerca del 100% de los metales estudiados y presentan actividad antimicrobiana.

The third issue of volume 46 of the year 2017 of Revista Colombiana de Química counts on the participation of different national and international authors. The contributions come from authors from Peru, United Kingdom, Argentina, Mexico, and Finland; Bogotá, Cúcuta and Barranquilla (Colombia). The contents of the number are shown below.

The section of Organic Chemistry and Biochemistry has four articles. In the first one, the solubility of the recombinant nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenyltransferase protein from *Plasmodium falciparum* produced in different *E. coli* vectors was studied. It was found that adding a label of maltose binding protein allows obtaining high purity functional proteins. In the second article of the section, the compounds present in ethanolic extracts of *Ichthyothere terminalis* collected in two regions of Colombia were identified by means of gas chromatography. There were differences in the composition, according to the place of origin of the samples. Furthermore, some of the compounds found may have repellent activity.

In the third article usnic acid from *Evernia prunastri* lichen collected in Cajamarca-Peru was isolated. Its acylhydrazone derivative was then synthesized, with 95% yield, by means of isoniazid condensation. Subsequently, the activity of both compounds (usnic acid and its derivative) against different strains of *Mycobacterium tuberculosis* was evaluated. Usnic acid had higher antibiotic effect than its derivative. The fourth article also studies natural compounds with antituberculosis activity, in this case, four alkaloids were isolated from *Ocotea discolor* collected in Duitama-Charalá road (Colombia). The alkaloids were characterized by nuclear magnetic resonance, mass spectra, and comparison with databases. All the alkaloids studied had a range of minimum inhibitory concentration of 140-310  $\mu\text{M}$ .

The section of Applied and Analytical Chemistry has two articles. In the first one,  $\text{CuO}$  nanoparticles were synthesized and characterized. The synthesis was made from  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  and the characterization was done using XRD, FTIR, TEM, and SEM. Their antimicrobial activity was then studied on four intrahospital strains collected in the Intensive Care Unit of a hospital in Lima. The inhibition halos of the strains were found to be higher for the nanoparticles synthesized from sulfate as compared to the synthesized from acetate. Finally, in the last article, four activated carbons present in commercial water filters were characterized, to verify that they could purify the Tumbes River (Peru) water. The structure and surface area of the coals, their ability to adsorb contaminating metals (As and Pb), and their antimicrobial capacity against three fecal bacteria were determined. It was found that the coals were microporous and mesoporous, had surface areas between 705 and 906  $\text{m}^2/\text{g}$ , adsorbed about 100% of the metals studied and presented antimicrobial activity.



Carlos A. Nieto C.<sup>1</sup>, Nicolás Forero B.<sup>1</sup>, María H. Ramírez H.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de investigaciones básicas en bioquímica (LIBBIQ), Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

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

Recibido: 29 de Septiembre de 2016. Aceptado: 7 de Marzo de 2017.

## Diseño y producción de diversas proteínas fusión de la nicotinamida/nicotinato mononucleotido adenilil transferasa (NMNAT) de *Plasmodium falciparum*

### Resumen

Las proteínas recombinantes se han convertido en herramientas útiles en la investigación bioquímica. Sin embargo, durante su producción, aparecen cuerpos de inclusión (IB), debido, por un lado, a la alta expresión de proteína producida a partir de los vectores usados que poseen promotores de alta eficiencia y, por otro lado, a características propias de la proteína. Ahora bien, la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenililtransferasa (NMNAT) es una proteína central en la biosíntesis del NAD(H)<sup>+</sup>, molécula esencial en el metabolismo celular, y ha sido estudiada en parásitos protozoos. Para el estudio de la NMNAT de estos parásitos se ha recurrido a la expresión de su versión recombinante en *E. coli*, obteniéndose gran cantidad de proteína como IB. Con el fin de aumentar la solubilidad de la proteína, se clonó la secuencia codificante de la NMNAT de *Plasmodium falciparum* en diferentes vectores de expresión, se indujo la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* BL21 (DE3) y se analizó la solubilidad. La proteína fusión con mayor solubilidad fue purificada y evaluada enzimáticamente. La adición de la etiqueta MBP (proteína de unión a maltosa) a la PfNMNAT incrementó su solubilidad y permitió obtener una proteína funcional con una alta pureza.

**Palabras clave:** solubilidad, PfNMNAT, cuerpos de inclusión, TAG fusión.

## Design and production of various fusion proteins of the nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylil transferase (NMNAT) of *Plasmodium falciparum*

### Abstract

Recombinant proteins have become useful tools in biochemistry research. During their production, however, inclusion bodies (IB) appear, on the one hand, due to the high expression rate from the recombinant plasmids, which have high efficiency promoters, and, on the other hand, intrinsic characteristics of the expressed protein. Furthermore, the nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylil transferase (NMNAT) is a central protein in NAD(H)<sup>+</sup> biosynthesis, an essential cofactor in cell metabolism, and in protozoan parasite has been studied. To study the NMNAT protein of these parasites, their recombinant version in *E. coli* has been expressed, getting a great quantity of IB as a by-product. To increase the solubility of the protein, the coding sequence of the NMNAT enzyme of *Plasmodium falciparum* was cloned in different expression plasmids which were subsequently transformed into *E. coli* BL21 (DE3) expression strain. The solubility of the recombinant proteins was assessed and the one with the highest presence in the soluble fraction was subsequently purified and its enzyme activity was determined. The recombinant protein with a MBP (maltose-binding protein) tag showed an increased solubility and purity.

**Keywords:** solubility, PfNMNAT, inclusion bodies, fusion TAG.

## Desenho e produção de várias proteínas fusão da nicotinamida/nicotinato mononucleotido adenilil transferasa (NMNAT) do *Plasmodium falciparum*

### Resumo

As proteínas recombinantes tem convertido em ferramentas úteis na investigação bioquímica. Um problema frequente durante a sua produção é a aparição de corpos de inclusão (IB), devida principalmente à elevada expressão da proteína produzida a partir dos vectores utilizados que têm promotores de elevada eficiência; bem como características das próprias proteínas. Além disso, a nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenililtransferasa é uma proteína central na biossíntese do NAD(H)<sup>+</sup>, molécula essencial no metabolismo celular, e tem sido estudada em protozoários parasitos. Para o estudo da NMNAT destes parasitos, foi realizada a expressão da sua versão recombinante em *E. coli*, e foi obtido uma grande quantidade de proteína em forma de IB. Com a finalidade de aumentar a quantidade de proteína na fração solúvel, a sequência codificadora para NMNAT de *Plasmodium falciparum* foi clonada em diferentes vectores de expressão, foi induzida a expressão da proteína recombinante em *E. coli* BL21(DE3) e foi analisada a solubibilidade. A proteína fusão com maior solubibilidade foi purificada e avaliada enzimáticamente. A adição da etiqueta MBP (proteína de união a maltosa) à PfNMNAT incrementou a solubibilidade da proteína e permitiu obter uma proteína funcional com uma alta pureza. espécie de planta.

**Palavras-Chave:** solubibilidade, PfNMNAT, corpos de inclusão, TAG fusão.

## Introducción

*Plasmodium falciparum* es un parásito protozoario intracelular causante de la forma más grave de malaria, una enfermedad de la cual en el último año se reportaron cerca de 212 millones de casos nuevos y 429.000 muertes (1). Dado que en la actualidad no existe una vacuna de uso clínico y ante el aumento de la resistencia del parásito contra medicamentos antimaláricos (e.g. cloroquina, artemisinina, etc.), la Organización Mundial de la Salud, en colaboración con diferentes laboratorios del mundo, se encuentra en la búsqueda de proteínas que sirvan como blancos terapéuticos para el control de la enfermedad (2).

En los últimos 20 años se ha venido estudiando la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adeniltransferasa NMNAT (EC 2.7.7.1/18), enzima en la cual convergen las rutas *de novo* y de reciclaje del dinucleótido de adenina y nicotinamida NAD(H) (3). El NAD(H) y su derivado fosforilado NADP(H) son esenciales en el metabolismo celular y, en el caso de *P. falciparum*, en el proceso de infección eritrocítica (4-6). Durante su ciclo de vida asexual, el parásito infecta a los glóbulos rojos y degrada la hemoglobina, tras lo cual incrementa el estrés oxidativo. Este aumento activa los sistemas antioxidantes del parásito que dependen del poder reductor del NADP(H) celular. Así mismo, en el proceso de infección, las rutas metabólicas, como el ciclo de las pentosas fosfato y la glicólisis, aumentan su actividad. Estas rutas dependen de NADP<sup>+</sup> y NAD<sup>+</sup>, respectivamente (7, 8).

La NMNAT de *P. falciparum* ha sido identificada y estudiada enzimáticamente como proteína recombinante en trabajos anteriores (9-11). Durante su expresión, se producen grandes cantidades de agregados insolubles conocidos como cuerpos de inclusión (CI o IB, acrónimo en inglés), compuestos principalmente por proteína mal plegada de poca utilidad respecto a la proteína soluble y de dispendiosa purificación. Con el fin de maximizar la cantidad de proteína recombinante soluble, se han propuesto varias estrategias: cambios en las condiciones de expresión, cepas, vectores, promotores y etiquetas (12). En este trabajo se reportan los resultados de la evaluación de varios vectores y etiquetas en la expresión y solubilidad de la NMNAT recombinante de *P. falciparum* (PfNMNAT).

## Materiales y métodos

### Estimación *in silico* de la solubilidad

Se escogieron los cuatro vectores más promisorios en cuanto a solubilidad, teniendo en cuenta tres aspectos: expresión, solubilidad y purificación (13). Los cuatro vectores escogidos fueron: Champion™ pET SUMO (ThermoFisher), el cual le otorga la etiqueta de 6His+SUMO (His + SUMO); pCold TF DNA (Takara), que fusiona la etiqueta de 6His+Chaperona Trigger Factor (His + TF); pBAD202/D-TOPO (Invitrogen), fusiona la etiqueta de Tiorredoxina (Trx) y pMAL-c5X (New England Biolabs) que su proteína fusión es la proteína de unión a maltosa (MBP).

Se implementaron tres programas bioinformáticos, SOLPro (14), PROSO II (15) y ESPRESSO (16), que estiman la solubilidad de la proteína recombinante expresada a partir del sistema heterólogo *E. coli*. Para esto, se tomó la secuencia primaria de la PfNMNAT (PF13\_0159), unida a las diferentes etiquetas moleculares aportadas por los vectores de expresión, y se identificó la probabilidad de encontrar esta proteína en la fracción soluble.

### Amplificación de la región codificante de la PfNMNAT

Para la amplificación de la región codificante de la PfNMNAT se usaron varias parejas de iniciadores que permitieron la clonación en los respectivos vectores de expresión (Tabla 1). Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron: 1 U de la enzima Taq Polimerasa (Applied Biosystems) o Pfu DNA Polimerasa (ThermoFisher), MgCl<sub>2</sub> o MgSO<sub>4</sub> (2,5 mM), buffer de la ADN polimerasa (1X), dNTP's (10 mM), H<sub>2</sub>O DEPC, iniciadores y aproximadamente 50 ng de ADN plantilla; todo a un volumen final de 15 µL. Se empleó el siguiente perfil térmico: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 min, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 50 °C por 1 min, 72 °C por 45 s, y una extensión final a 72 °C por 10 min (termociclador Biorad) (10).

**Tabla 1.** Iniciadores utilizados para la amplificación de la región codificante de la PfNMNAT

Primer	Secuencia 5'-3'
Directo petSumo	ATGCATAAGAATATATGT
Directo pBAD	caccATGCATAAGAATATATGT
Directo pMal y pCold	ggatccATGCATAAGAATATATGT
Reverso	CTAATTAAAATCATATAAGTT

### Clonación de la región codificante de la PfNMNAT

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa 1%. Para realizar la clonación se usaron dos estrategias dependiendo del vector de expresión: ligación directa con el producto de PCR o subclonación utilizando el vector pGEM®-T Easy (PROMEGA). La ligación se realizó teniendo en cuenta una relación 1:1 inserto purificado y vector (aproximadamente 50 ng).

### Transformación en cepas de *E. coli*

Se transformaron cepas de *E. coli* de mantenimiento One Shot Mach1™ T1 (ThermoFischer) y de expresión BL21(DE3) (Sigma-Aldrich) químicamente competentes, mediante choque térmico (42 °C durante 45 s, 5 min en hielo). Inmediatamente, las bacterias transformadas se incubaron durante 1 h a 37 °C en medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y glucosa 20 mM). Luego, se sembraron en cajas de Petri con LB-agar y antibiótico de selección respectivo para cada vector.

### Purificación del ADN recombinante

Se partió de un cultivo de 10 mL, inoculando en medio LB líquido suplementado con el antibiótico de selección. Se utilizó el método de lisis alcalina (17).

## Expresión de las proteínas recombinantes

Se tomó una colonia de cada uno de los plásmidos recombinantes y se inocularon individualmente en medio LB, suplementado con el antibiótico de selección; se dejaron creciendo toda la noche a 37 °C. Se realizó una dilución del cultivo 1:100 y se continuó el crecimiento hasta alcanzar una D.O ~ 0,6 a 600 nm. Se realizó la inducción de la expresión de las proteínas siguiendo las recomendaciones del fabricante con IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) o arabinosa, según el caso, incubando a 15–25 °C con agitación constante. Finalizada la inducción, se colectaron las bacterias por centrifugación a 6000 rpm por 15 min a 4 °C; se descartó el sobrenadante y se determinó el peso húmedo de células.

## Lisis celular

Los pellets celulares se resuspendieron en buffer de lisis (5 mL/g). Se adicionó lisozima (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 mg/mL; ARNasa (ThermoFisher), a una concentración final de 6,25 µg/mL, y cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) P8340; AEBSEF 1 mM, E64 14 µM, Pepstatin A 15 µM, Bestatin 40 µM, Leupeptin 20 µM, Aprotinin 0,8 µM. El conjunto se incubó en hielo durante 30 min con agitación mecánica. Pasado este tiempo, se sometió la muestra a 5 min de sonicación sobre hielo (50% de amplitud, 15 s de pulso y 15 s de reposo). La muestra fue centrifugada a 12000 rpm por 20 min a 4 °C, separándose el sobrenadante (fracción soluble) y el pellet (fracción insoluble o cuerpos de inclusión).

## Detección de las proteínas recombinantes por electroforesis SDS-PAGE y western blot

Los lisados de los clones inducidos se analizaron por electroforesis vertical SDS-PAGE. Para esto se tomó una alícuota de las fracciones solubles obtenidas en la lisis y se resuspendieron en buffer de carga desnaturizante. Las muestras se calentaron a 92 °C durante 7 min. La visualización de las bandas se logró mediante la tinción del gel con azul de Coomassie. Para los ensayos de inmunodetección (western blot), las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa (ThermoFisher), usando el método de electrotransferencia húmeda (18), en buffer de transferencia aplicando 200 mA por 2 h. A su término, se tiñó la membrana con Rojo Ponceau (Sigma-Aldrich) y se realizó la inmunodetección. Se identificó el sistema de expresión que tuvo mayor aumento de solubilidad mediante la confirmación en western blot y se realizaron ensayos de purificación.

## Purificación de la proteína recombinante por afinidad a resina de amilosa

La proteína MBP-PfNMNAT (MBP, maltose-binding protein) se purificó a partir de la fracción soluble mediante afinidad a resina de amilosa (NEB). La resina se equilibró con buffer de lisis y se mezcló con la fracción soluble diluida (1:6). La unión se llevó a cabo durante 1 h a 4 °C con agitación constante. La mezcla se transfirió a una mini columna, empacándose la resina y obteniéndose las proteínas no unidas. La resina se lavó con 12 volúmenes de buffer de lisis.

La proteína MBP-PfNMNAT se eluyó con buffer de elución (buffer de lisis + maltosa 10 mM); se recolectaron 25 fracciones de aprox. 60 µL, que fueron suplementadas con glicerol (10% v/v) y almacenadas a -80 °C. La proteína en la fracción soluble y en los eluidos se cuantificó mediante el método de Bradford (19).

## Ensayo de actividad enzimática

Se realizó un ensayo *in vitro* para determinar la actividad de la proteína recombinante purificada. Las mezclas de reacción (mononucleótido de nicotinamida (NMN) 1 mM y ATP 1,3 mM en buffer HEPES 100 mM + Mg<sup>2+</sup> 10 mM, pH 7,5) se incubaron a 37 °C durante 30 min, al término de lo cual se detuvo la reacción con HClO<sub>4</sub> 1,2 M a 4 °C. La proteína se precipitó mediante centrifugación a 12000 rpm durante 3 min a 4 °C. Se neutralizó el sobrenadante con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M en hielo. El resultado de la reacción *in vitro* se evaluó mediante HPLC en fase reversa. Se utilizó una columna Phenomenex Luna C18 (250 mm x 4,60 mm; 5 µm). El volumen de inyección fue de 50 µL. Fases móviles: buffer fosfato de potasio 0,12 M pH 6,0 y metanol. Flujo constante de 1,5 mL/min, con un tiempo de 20 min por corrida a temperatura ambiente. Detección espectrofotométricamente a 254 nm.

## Resultados y discusión

### Estimación *in silico* de la solubilidad

El estudio bioinformático indicó una mayor solubilidad de la proteína PfNMNAT expresada desde el vector pMAL-c5X. Los resultados para la PfNMNAT expresada desde los otros vectores no fueron concluyentes, pues se encontraron divergencias con los programas empleados. Aunque todos los programas predicen solubilidad del 50% aproximadamente, como control se usa la secuencia primaria de la proteína sin ninguna etiqueta, donde se puede observar que la expresión de esta proteína en el sistema heterólogo sería insoluble.

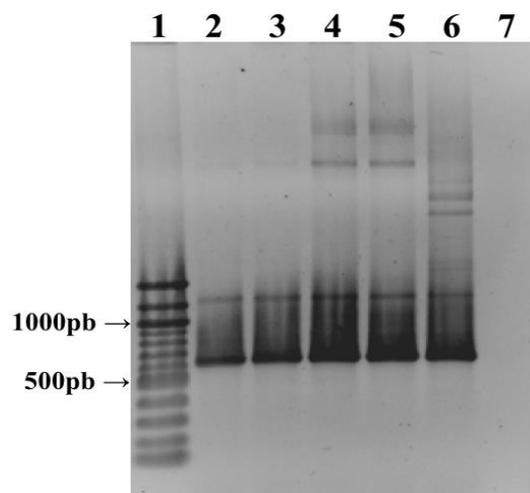
Lo anterior es predecible, debido a que es una proteína externa de la bacteria y por ende no se puede resolver su plegamiento. Por tanto, es importante adicionar las etiquetas para obtener la versión recombinante de forma soluble (Tabla 2). Entonces, se evaluó el desempeño de estos vectores y etiquetas en la solubilidad experimentalmente.

**Tabla 2.** Predicción *in silico* de la solubilidad de las proteínas recombinantes PfNMNAT usando programas bioinformáticos

	SolPro	ProSo II	ESPRESSO
pCOLD-PfNMNAT	53,5%	66,7%	48,3%
pMAL C5X-PfNMNAT	60,6%	70,3%	50,0%
pET SUMO-PfNMNAT	20,3%	43,3%	46,1%
PfNMNAT	17,7%	53,7%	44,5%

## Amplificación, clonación y transformación

Se obtuvieron los productos de PCR deseados para cada pareja de iniciadores. La clonación en los tres vectores empleados fue exitosa, después del análisis por PCR y digestión con enzimas de restricción (Figura 1).



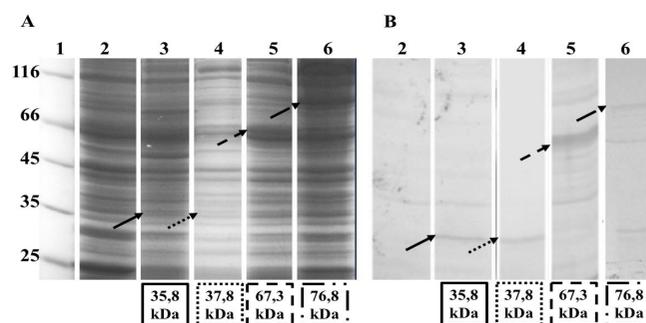
**Figura 1.** Verificación de los plásmidos recombinantes de la PfNMNAT mediante PCR. 1: Marcador de peso AxyGen 100 pb, 2 y 3: ADN plasmídico extraído pCOLD-PfNMNAT, 4 y 5: ADN plasmídico extraído pMal c5X-PfNMNAT 6: Control positivo de la reacción y 7: Negativo de la reacción. (Tamaño esperado 615 pb). Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio

## Expresión de las proteínas recombinantes

En la figura 2 se muestra el perfil electroforético de cada uno de los sistemas de expresión evaluados. Se observa una mayor expresión de la proteína con la etiqueta MBP (~ 67,3 kDa) respecto a las otras etiquetas: His + SUMO (~ 5,8 kDa), Trx (~ 37,8 kDa) y His-TF (76,8 kDa), tal y como se predijo en los programas bioinformáticos. Hasta el día de hoy no se tiene claro el mecanismo por el cual la proteína fusión puede modificar la solubilidad de la proteína de interés, sin embargo, la MBP es una de las más estudiadas. La proteína de unión a maltosa puede estar funcionando como una chaperona molecular que, mediante su bolsillo hidrofóbico, secuestra la proteína con plegamiento intermedio y le da una segunda oportunidad de plegamiento. Esto permite que la proteína recombinante tenga el plegamiento nativo y, por ende, se encuentre en la fracción soluble; si, por el contrario, no se puede resolver el plegamiento, formará agregados insolubles (20, 21).

La proteína MBP fusionada a la PfNMNAT en la región amino terminal permite realizar la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad, debido a la elevada interacción de la resina de amilosa por las proteínas recombinantes que contienen la etiqueta. MBP consta de dos dominios estructurales en forma de bisagra que le permiten interactuar con diversos azúcares como la amilosa y la maltosa. La unión con ellas genera un cambio conformacional que cierra la proteína con la cual se enlaza al azúcar a través de enlaces de puentes de hidrógeno y por contactos de Van der Waals, principalmente con residuos aromáticos, causando un apilamiento de las cadenas laterales contra la cara de los anillos de azúcar.

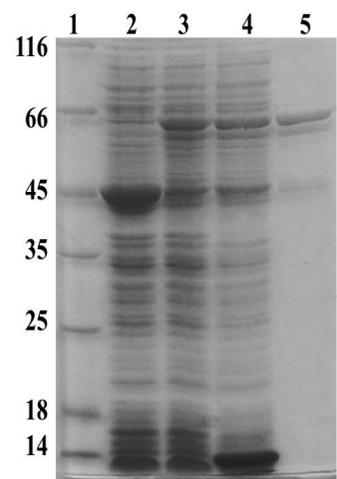
Se espera que el tamaño de la proteína fusión (42,5 kDa) no interfiera en la estructura y función de la proteína purificada, lo cual se confirmó mediante ensayos enzimáticos posteriores.



**Figura 2.** Análisis de la expresión soluble de las proteínas recombinantes PfNMNAT en BL21 (DE3). 1. Patrón de peso molecular en kDa (ThermoFisher). 2. Proteínas solubles BL21 (DE3) sin transformar. 3. Proteínas solubles expresión de His + SUMO-PfNMNAT. 4. Proteínas solubles expresión de Trx-PfNMNAT. 5. Proteínas solubles expresión de MBP-PfNMNAT. 6. Proteínas solubles expresión de His + TF-PfNMNAT. A. SDS-PAGE 12% teñido con azul de Coomassie. B. Inmunodetección en membrana de PVDF. (Las flechas indican las proteínas sobreexpresadas y reconocidas en el western blot, las bandas inespecíficas son comunes hasta en el control negativo y se deben a reconocimiento con el anticuerpo primario)

## Purificación mediante afinidad a amilosa

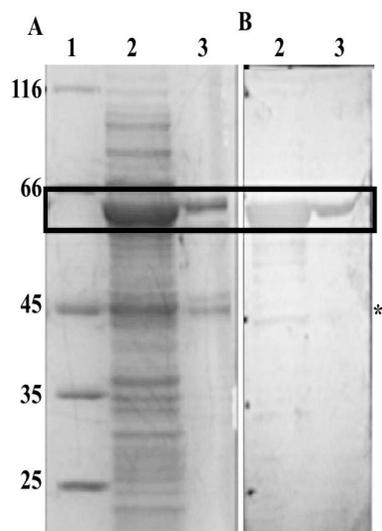
La purificación de la proteína se llevó a cabo en condiciones nativas, buscando no interferir en la funcionalidad y estructura. La purificación por cromatografía de afinidad se siguió mediante SDS-PAGE (figura 3).



**Figura 3.** Expresión y purificación de la MBP-PfNMNAT. 1. Patrón de peso molecular en kDa (ThermoFisher). 2. Proteínas totales expresión etiqueta MBP (Control). 3. Proteínas totales expresión de MBP-PfNMNAT. 4. Proteínas solubles expresión de 15 MBP-PfNMNAT. 5. Eluido de la purificación de la MBP-PfNMNAT. SDS-PAGE 10% Teñido con azul de coomassie. \* Corresponde a MBP como producto de degradación

Se observó que, a partir de los lavados, se eliminó una gran cantidad de proteínas no unidas, permitiendo obtener eluidos con la proteína recombinante parcialmente pura y concentrada. Se presentó una pequeña contaminación por una proteína de aproximadamente 45 kDa correspondiente a un producto de degradación, debido a una alta tasa de degradación de la proteína recombinante PfNMNAT sobreexpresada, y el tamaño corresponde a la etiqueta (MBP) que por el contrario es muy estable.

Esta información se corroboró mediante western blot usando anti-MBP, en el cual se observó reconocimiento del producto de degradación (Figura 4).



**Figura 4.** Purificación de la proteína recombinante MBP-PfNMNAT. 1: Patrón de peso molecular en kDa (ThermoFisher), 2: Fracción soluble, 3: Purificación de MBP-PfNMNAT. A. SDS-PAGE 12% teñido con azul de coomassie, B. Inmuno-detección en membrana de PVDF. Anticuerpo 1°: Anti-MBP 1:10000. \* producto de degradación MBP

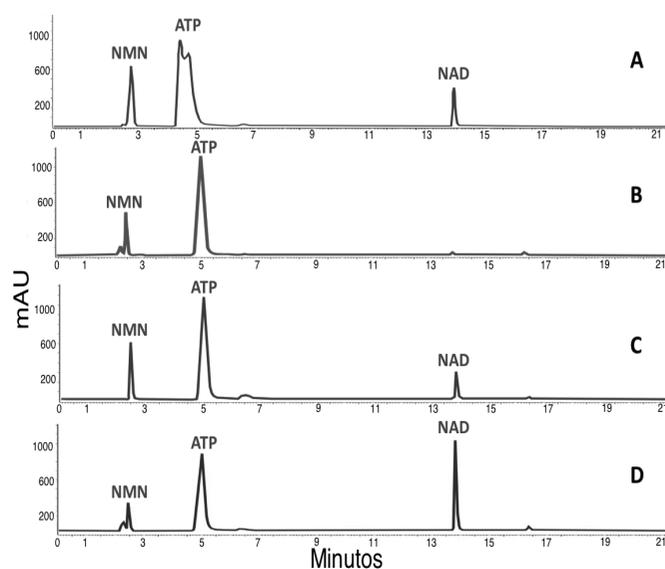
### Ensayos de actividad enzimática

La actividad nucleotidiltransferasa de la proteína recombinante se evaluó mediante ensayos NMNAT directos y la posterior observación del pico correspondiente al NAD<sup>+</sup> sintetizado por HPLC en fase reversa (Figura 5). Respecto a la actividad encontrada en la fracción soluble, en el eluido de la purificación por afinidad fue 18,4 veces mayor (Tabla 3), permitiendo obtener buenos rendimientos para la proteína recombinante.

**Tabla 3.** Rendimiento de la purificación de la MBP-PfNMNAT

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad total (mU*)	Actividad específica (mU/mg)	Recuperación (%)	Purificación (veces)
Soluble	6,96	185,185	26,607	100	-
Eluido	0,29104	142,716	490,365	77,06	18,4

\*Una unidad de actividad enzimática representa la cantidad de enzima que cataliza la síntesis de 1 μmol de NAD<sup>+</sup> por minuto a 37 °C



**Figura 5.** Verificación de la actividad catalítica de la MBP-PfNMNAT cuantificada en RP-HPLC. A. Patrones, B. Control negativo (Buffer de elución de la proteína), C. Fracción soluble. D. MBP-PfNMNAT

### Conclusiones

La fusión de la etiqueta MBP permitió un aumento en la solubilidad de la proteína PfNMNAT en comparación con las otras etiquetas usadas, lo cual, además, facilitó la obtención de la proteína con un alto porcentaje de purificación y buen rendimiento. Sin embargo, la adición de etiquetas de solubilización para la producción de proteínas recombinantes no garantiza la solubilidad de la proteína a expresar, ya que depende de características intrínsecas de cada proteína y de la interacción con la etiqueta.

Se recomienda el uso de programas bioinformáticos como la primera aproximación para el uso de las etiquetas, con el objetivo de determinar su posible efecto sobre la solubilidad. No obstante, hay que tener precaución con los resultados de la predicción, ya que estos dependen de la matriz de proteínas de comparación.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Colciencias por la financiación del proyecto 110156935240 y a la convocatoria 645 *Jóvenes investigadores e innovadores* 2014. A la Universidad Nacional de Colombia, a miembros y ex miembros del laboratorio de investigaciones básicas en bioquímica (LIBBIQ).

### Referencias

- World Health Organization. *World Malaria Report 2016*. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252038/1/9789241511711-eng.pdf?ua=1>. [Consultado el 22 de febrero de 2017]
- World Health Organization. *Estrategia técnica mundial contra la malaria 2016 - 2030*. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186671/1/9789243564999\\_spa.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186671/1/9789243564999_spa.pdf?ua=1). [Consultado el 22 de febrero de 2017]

3. Katoh, A.; Uenohara, K.; Akita, M.; Hashimoto. Early steps in the biosynthesis of NAD in Arabidopsis start with Aspartate and occur in the plastid. *Plant Physiol*, **2006**, *141* (3), 851–857. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.081091>.
4. Zerez, C.; Roth, E.; Schulman, S.; Tanaka, K. Increased nicotinamide adenine dinucleotide content and synthesis in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood*, **1990**, *75* (8), 1705-10.
5. Merrick, C.; Duraisingh, M. *Plasmodium falciparum* Sir2: an unusual sirtuin with dual histone deacetylase and ADP-ribosyltransferase activity. *Eukaryot Cell*, **2007**, *6* (11), 2081-91. DOI: <http://doi.org/10.1128/EC.00114-07>.
6. Eren, D. *Plasmodium falciparum*, enzymes involved in redox balancing of nicotinamide nucleotides. Ph.D. Dissertation [Online]. College of Medicine, Drexel University. September 2003. P. 186. <https://idea.library.drexel.edu/islandora/object/idea%3A477/datastream/OBJ/view> [Consultado el 22 de febrero de 2017].
7. Muller, S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **2004**, *53* (5), 1291-305. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04257.x>.
8. Olszewski, K.; Morrissey, J.; Wilinski, D.; Vaidya, A.; Rabinowitz, J.; Llinás, M. Host-parasite interactions revealed by *Plasmodium falciparum* metabolomics. *Cell Host Microbe*, **2009**, *5* (2), 191-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.004>.
9. O'Hara J.; Kerwin L.; Cobbold S.; Tai J.; Bedell T.; Reider, P.; *et al.* Targeting NAD<sup>+</sup> Metabolism in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Plos ONE*, **2014**, *9* (4), e94061. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0094061>.
10. Marín, C.; Ramírez-Hernández, M. H. Identificación, expresión y caracterización de la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenililtransferasa de *Plasmodium falciparum* (PfNMNAT). M. S. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, 2010.
11. Sánchez, L.; Ramírez-Hernández, M. H. Obtención y caracterización parcial de la proteína recombinante nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de *Plasmodium falciparum* (PfNMNAT). Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Colombia, 2011.
12. Birkholtz, L.; Blatch, G.; Coetzer, T.; Hoppe, H.; Human, E.; Morris, E.; *et al.* Heterologous expression of plasmodial proteins for structural studies and functional annotation. *Malar. J.* **2008**, *7*, 197. DOI: <http://doi.org/10.1186/1475-2875-7-197>.
13. Costa, S.; Almeida, A.; Castro, A.; Domingues, L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 63. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00063>.
14. Magnan, C.; Randall, A.; Baldi, P. SOLpro: accurate sequence-based prediction of protein solubility. *Bioinformatics*, **2009**, *25* (17), 2200-2207 DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp386>.
15. Smialowski, P.; Doose, G.; Torkler, P.; Kaufmann, S.; Frishman, D. PROSO II – a new method for protein solubility prediction. *FEBS J.* **2009**, *279*, 2192–2200. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08603.x>.
16. Hirose, S.; Kawamura, Y.; Yokota, K.; Natsume, T.; Komiya, K.; Tsutsumi, T.; *et al.* Statistical analysis of features associated with protein expression/solubility in an *in vivo Escherichia Coli* expression system and a wheat germ cell-free expression system. *J. Biochem.* **2011**, *150* (1), 73-81. DOI: <https://doi.org/10.1093/jb/mvr042>.
17. Sambrook, J.; Ruseell, D. *Molecular cloning: a laboratory manual* Tercera edición. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; 15.14 - 15.49.
18. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1979**, *76* (9), 4350-4.
19. Bradford, 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.
20. Kapust, R.; Waugh, D. S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1668–1674. DOI: <http://dx.doi.org/10.1110/ps.8.8.1668>.
21. Fox, J.; Kapust, R.; Waugh, D. Single amino acid substitutions on the surface of *Escherichia coli* maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 622–630. DOI: <http://dx.doi.org/10.1110/ps.45201>.
22. Duan, X.; Quioco, F. Structural evidence for a dominant role of nonpolar interactions in the binding of a transport/chemosensory receptor to its highly polar ligands. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 706–712. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/bi015784n>.
23. Sharff, A.; Rodseth, L.; Spurlino, J.; Quioco, F. Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the 2 domains of the maltodextrin binding-protein involved in active-transport and chemotaxis. *Biochemistry*, **1992**, *31*, 10657–10663. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/bi00159a003>.
24. Spurlino, J.; Lu, G.; Quioco, F. The 2.3-Å resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 5202–5219.

**Article citation:**

Nieto, C. A.; Forero, N.; Ramírez, M. H. Diseño y producción de diversas proteínas fusión de la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT) de *Plasmodium falciparum*. *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, *46* (3), 5-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n3.63492>.



Luz Yineth Ortiz-Rojas<sup>1\*</sup>, Giovanni Chaves-Bedoya<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación PLANTAE. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Norte de Santander

\*Autor para correspondencia: luzyinethortiz@ufps.edu.co; gchavesb@ufps.edu.co

Recibido: 8 de Enero de 2017. Aceptado: 29 de Marzo de 2017.

## Composición fitoquímica del extracto de raíz de *Ichthyothere terminalis* de dos regiones geográficas de Colombia

### Resumen

Se reporta el análisis fitoquímico de dos extractos de raíz de *Ichthyothere terminalis*, colectadas en las localidades de Cumaral (Meta) y Abrego (Norte de Santander), Colombia. Los extractos se obtuvieron en etanol por destilación a presión reducida y fueron caracterizados por pruebas cualitativas, así como por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El análisis GC-MS reveló diferencias en los compuestos en *Ichthyothere terminalis* de acuerdo al lugar de procedencia. Las plantas procedentes de Cumaral contienen saponinas, cumarinas y taninos, mientras que las procedentes de Abrego contienen alcaloides taninos, cumarinas y flavonoides. El extracto etanólico de Abrego presenta principalmente octadecandien-1-ol (53,5%), óxido de cariofileno (30,8%), hexadecanol (24,0%), *trans*- $\beta$ -cariofileno (13,6%), cicloisolongifoleno (11,6%), germancreno D (6,0%) y 9-octadecen-1-ol (8,0%). Las plantas de Cumaral presentan principalmente citronelal (46,4%), *p*-cimeno (6,4%), geraniol (5,0%) y citronelol (4,6%). Entre los compuestos químicos encontrados, varios poseen propiedades repelentes de acuerdo a los reportes etnobotánicos de la región Amazónica. Estudios adicionales podrán determinar la efectividad como repelente de los extractos de raíz de *I. terminalis*.

**Palabras clave:** *Asteraceae*, fitoquímica, *Ichthyothere terminalis*, metabolitos secundarios.

## Phytochemical composition of the root extract of *Ichthyothere terminalis* from two geographical regions in Colombia

### Abstract

The phytochemical analysis of two extracts from *Ichthyothere terminalis* root which were collected in the localities of Cumaral (Meta) and Abrego (Norte de Santander), Colombia is reported. Extracts were obtained with ethanol using distillation under reduced pressure and were characterized by qualitative assays and by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS). GC-MS analysis revealed differences in *Ichthyothere terminalis* compounds according to locality. Plants from Cumaral contain saponins, coumarins, and tannins, while those from Abrego contain tannins, alkaloids, coumarins, and flavonoids. Plants from Abrego contain octadecandien-1-ol (53.5%), caryophyllene oxide (30.8%), hexadecanol (24.0%), *trans*- $\beta$ -caryophyllene (13.6%), cycloisolongifolene (11.6%), germacrene D (6.0%), and 9-octadecen-1-ol (8.0%). Plants from Cumaral have citronellal (46.4%), *p*-cymene (6.4%), geraniol (5.0%), and citronellol (4.6%). Among the chemical compounds found, several have repellent properties, according to ethnobotanics reports from Amazonian Region. Further studies may determine the effectiveness as repellent of extracts from *I. Terminalis* root.

**Keywords:** *Asteraceae*, phytochemistry, *Ichthyothere terminalis*, secondary metabolites.

## Composição fitoquímica do extracto de raiz de *Ichthyothere terminalis* de duas regiões geográficas da Colômbia

### Resumo

Foi reportada a análise fitoquímica de dois extratos da raiz de *Ichthyothere terminalis*, coletadas nas localidades de Cumaral (departamento do Meta) e Abrego (Departamento de Norte de Santander) em Colômbia. Os extratos foram obtidos em etanol por destilação a pressão reduzida, assim como por cromatografia de gases acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). A análise GC-MS revelou diferenças nos compostos em *Ichthyothere terminalis* de acordo a seu lugar de procedência. As plantas procedentes de Cumaral contêm saponinas, cumarinas e taninos por enquanto as procedentes de Abrego contêm alcaloides taninos, cumarinas e flavonoides. O extrato etanólico de Abrego apresenta maioritariamente octadecandien-1-ol (53,5%), oxido de cariofileno (30,8%), hexadecanol (24,0%), *trans*- $\beta$ -cariofileno (13,6%), cicloisolongifoleno (11,6%), germancreno D (6,0%) e octadecen-1-ol (8,0%). As plantas de Cumaral apresentam maioritariamente citronelal (46,4%), *p*-cimeno (6,4%), geraniol (5,0%) e citronelol (4,6%). Entre os compostos químicos encontrados destacam-se vários que possuem propriedades repelentes. Estudos adicionais poderão determinar a efetividade como repelente dos extractos de raiz de *I. terminalis*.

**Palavras-Chave:** *Asteraceae*, fitoquímica, *Ichthyothere terminalis*, metabolitos secundários.

## Introducción

Las plantas poseen metabolitos secundarios que pueden localizarse principalmente en hojas, tallos, flores y raíces dependiendo de la especie. Estos metabolitos secundarios desempeñan un papel importante como disuasorio en las interacciones planta-insecto (1). Algunas plantas poseen compuestos que producen síntomas específicos sobre los insectos, actuando como neurotóxicos, por ejemplo los monoterpenos, compuestos altamente selectivos que actúan sobre los receptores de la octapamina presente en los insectos (2).

Junto al conocimiento etnobotánico, el estudio de la composición química de las plantas puede identificar el aprovechamiento potencial en el campo de la medicina o a nivel agronómico. Por tal razón, es importante dirigir la atención al estudio fitoquímico de plantas endémicas o nativas, con el fin de identificarlas taxonómica y químicamente. Ahora bien, *Ichthyothere* es un género de plantas con flores, ubicadas en algunas partes de Sur América y América Central (3). El constituyente activo de esta planta es una sustancia llamada ictiotereol, compuesto tóxico para peces y mamíferos (4). Por tanto, las hojas de *Ichthyothere terminalis* se emplean tradicionalmente por los indígenas de la cuenca baja del Amazonas para envenenar murciélagos y por pescadores como repelente de insectos (4, 5).

La especie *Ichthyothere terminalis* (Spreng) S.F. Blake (flor blanca), pertenece a la familia *Asteraceae*. En Colombia se encuentran colecciones de *Ichthyothere terminalis* en el Herbario de la Universidad de los Llanos (Cumaral, Meta) y en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá.

Por su parte, la composición química puede variar aún dentro de una especie botánica y estas variaciones pueden deberse a la presencia de diferentes quimiotipos, de acuerdo a la adaptación de la planta al ambiente circundante, así como al estado de desarrollo. La composición química de una planta proporciona sus propiedades intrínsecas y valor económico (6). Así, el objetivo de este trabajo fue realizar el estudio fitoquímico y los perfiles cromatográficos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) de distintas muestras de raíz de *Ichthyothere terminalis* procedentes de las regiones del Meta y Norte de Santander, Colombia.

## Materiales y métodos

### Materia vegetal

Se comparó la composición química de las raíces de cuatro plantas de *Ichthyothere terminalis*, dos colectadas en la localidad de Abrego, departamento de Norte de Santander en la región Andina, y dos colectadas en la Orinoquía en la localidad de Cumaral, departamento del Meta. La identificación taxonómica fue realizada por personal del herbario de la Universidad de los Llanos (Meta) COL000078872 y el Herbario del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (Localidad Abrego, Norte de Santander COL000078854). Las raíces de *Ichthyothere terminalis* de las dos localidades fueron secadas y molidas y colocadas por separado en etanol al 96%.

### Análisis de suelos

Con el propósito de determinar las características del suelo en los lugares de colecta, se tomaron y analizaron muestras de suelo de las localidades de Abrego y Cumaral. Las muestras se enviaron a analizar en el laboratorio Terrallanos, en la ciudad de Villavicencio-Colombia.

### Extracción y tamizaje fitoquímico

Para la obtención del extracto de raíz, se utilizaron 250 g de material vegetal fresco; el metabolismo se detuvo con nitrógeno líquido. Las muestras se trataron con etanol al 96% a temperatura ambiente en agitación por 48 h. El extracto etanólico resultante se concentró, eliminando el solvente por destilación a presión reducida en un rota evaporador IKA® RV 10 CONTROL. Para el análisis fitoquímico se diseñó un protocolo modificado basado en las metodologías y pruebas cualitativas propuestas previamente por varios autores (7-10). Las modificaciones a los diferentes protocolos se implementaron para diferentes propósitos como: quitar pigmentos de fondo que puedan enmascarar la presencia de metabolitos en pruebas específicas.

### Análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

La extracción-concentración simultánea de los compuestos de la fase de vapor de las muestras se llevó a cabo usando la técnica de microextracción en fase sólida (SPME), con monitoreo en fase de vapor (*head space*) empleando una fibra de sílice fundida recubierta con polidimetilsiloxano-divinilbenceno de 65 µm de espesor (PDMS-DVB-65 µm, Sigma). El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases 6890 Series Plus (Agilent Technologies, USA), acoplado a un detector selectivo de masas (Agilent Technologies MSD 5973, USA).

La columna empleada en el análisis fue DB-5MS [5%-fenil-poli (metilsilano), 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent]; la inyección se realizó con el dispositivo de SPME. La identificación de los metabolitos secundarios se estableció con base en sus espectros de masas (EI, 70 eV), usando las bases de datos de Adams, Wiley 138 y NIST05 (11-13) en el Laboratorio CENIVAM de la Universidad Industrial de Santander.

## Resultados y discusión

En este manuscrito se reporta el estudio de la composición química de las fracciones volátiles y características fitoquímicas de la raíz de *I. terminalis*. A pesar de los reportes empíricos de su posible acción repelente, la composición química en plantas del género *Ichthyothere* es escasa (14-15).

### Análisis de suelos

Los resultados del análisis de suelos de las dos localidades muestreadas presentaron características diferentes con respecto a su composición y textura. Abrego presenta un suelo con un pH 4,9 y una textura arcillolimoso (ArL) con concentraciones altas de Al (1,20 meq/100 g), Mn (27,50 ppm) y un porcentaje alto de Mg (26,36%).

Por otro lado, el suelo de la localidad de Cumaral se caracteriza por concentraciones altas de Ca (14,0 meq/100 g), Fe (276,87 ppm), Mn (213,12 ppm), Zn (15,30 ppm), B (0,87 ppm) y un porcentaje alto de saturación de Ca (68,29%) con un pH de 5,1. Los resultados completos del análisis se indican en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características físicas y químicas de los suelos de las localidades de Abrego (Norte de Santander) y Cumaral (Meta) donde se tomaron muestra de las plantas de *Ichthyothere terminalis*

Características del suelo	Abrego (Norte de Santander)	Cumaral (Meta)
pH	4,9	5,1
Materia Orgánica %	1,0	18,90
P (ppm)	2,7	23,7
Al (meq/100g suelo)	1,2	0,08
Ca (meq/100g suelo)	1,80	14,00
Mg (meq/100g suelo)	2,90	1,7
K (meq/100g suelo)	0,21	0,28
Cu (ppm)	0,95	2,7
Fe (ppm)	43,75	276,87
Mn (ppm)	27,50	213,87
Zn (ppm)	1,35	15,30
Porcentaje de Saturación de Ca	16,36	68,29
CIC	11,0	20,5
Textura	ArL	F

A partir de la Tabla 1 se observa que el suelo de Cumaral es más rico tanto en materia orgánica como en elementos minerales, lo que puede determinar variaciones en la presencia y cantidad de metabolitos secundarios en las raíces de *Ichthyothere terminalis*. La concentración de estos minerales presentes en el suelo desempeñan una función vital en el metabolismo secundario vegetal y la producción de moléculas bioactivas de relevancia como alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, aceites volátiles, taninos, resinas, glucósidos, etc. (16). La acumulación y biosíntesis de estas moléculas bioactivas en los sistemas vegetales dependen ampliamente de la disponibilidad de elementos minerales en el suelo (17). Las principales diferencias en la composición química de los extractos de raíz, pudieron evidenciarse con el análisis GC-MS.

### Análisis fitoquímico

La detección de los metabolitos secundarios se realizó según los ensayos cualitativos individuales para cada grupo químico (Tabla 2). En ambas muestras se identificó la presencia de alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides, triterpenoides y diterpenos, mientras que las cumarinas se presentan solamente en el extracto de raíz de *I. terminalis* de la localidad de Abrego.

**Tabla 2.** Resultados del análisis fisicoquímico de extractos de raíz de *Ichthyothere terminalis* de Abrego y Cumaral

Metabolitos	Ensayos	Abrego (Norte de Santander)	Cumaral (Meta)
Alcaloides	Dragendorff	+	+
	Mayer		
Saponinas	Espuma	+	+
	Rosenthaler		
	Agar sangre		
Taninos	Gelatina-sal/Cloruro férrico	+	+
Glucósidos cianogénicos	Reacción de Guignard	-	-
Flavonoides	Shinoda	+	+
Cumarinas	NaOH	+	-
	Hidroxamato férrico	+	-
Glucósidos cardiotónicos	Reacción de Legal	-	-
Esteroides y triterpenoides	Liebermann-Burchard	+	+
Diterpenos y triterpenos	Molibdato de amonio	+	+
Quinonas	Bornträger-Kraus	-	-

(+) Presencia (-) Ausencia

### Análisis GC-MS

El análisis GC-MS de los extractos de las raíces de *I. terminalis* de las dos localidades indica que existen diferencias tanto en la identidad de los compuestos como en las cantidades relativas > 1% que correspondieron del 84% al 95% de la composición del total de los extractos. En el caso del extracto de raíz de la localidad de Cumaral, los metabolitos secundarios volátiles más abundantes que se encontraron fueron citrionelal (46,4%),  $\gamma$ -terpineno (6,6%), *p*-cimeno (6,4%), geraniol (5,0%), citrionelol (4,6%),  $\alpha$ -pineno (2,5%), linalool (2,2%), isopulegol (1,7%), acetato de citrionelilo y dimetilbenceno (1,5%), geranial (1,3%),  $\beta$ -elemeno y  $\beta$ -maalieno (1,2%), y limoneno (1,1%) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Componentes mayoritarios identificados por GC-MS en extractos etanólicos de raíz de *Ichthyothere terminalis* Cumaral, Meta

Orden elución	T <sub>R</sub> (min)	Compuesto	Cantidad Relativa %
1	13,94	Etilbenceno	0,3
2	14,34	Dimetilbenceno	1,5
3	14,40	Dimetilbenceno (isómero)	0,7
4	15,37	Dimetilbenceno (isómero)	0,2
5	16,87	$\alpha$ -Tujeno	0,2
6	17,24	$\alpha$ -Pino	2,5
7	18,99	Sabieno	0,4
8	19,16	$\beta$ -Pino	0,2
9	19,40	6-Metil-5-hepten-2-ona	0,3
10	19,62	$\beta$ -Miceno	0,3
11	21,24	<i>p</i> -Cimeno	6,4
12	21,54	Limoneno	1,1
13	21,61	1,8-Cineol	0,9
14	22,65	$\gamma$ -Terpineno	6,6
16	24,28	Linalool	2,2
17	24,48	Nonanal	0,2
18	25,26	<i>endo</i> -Fencol	0,4
19	26,38	Citronelal	46,4
20	26,83	Isopulegol	1,7
21	27,66	Terpinen-4-ol	0,6
22	28,29	NI, Compuesto oxigenado M <sup>+</sup> 152	0,5
23	28,71	Verbenona	0,3
24	29,14	Citronelol	4,6
25	29,66	Neral	1,6
26	30,02	Geraniol	5,0
27	30,71	Geranial	1,3
28	31,51	Timol	0,5
29	33,66	Acetato de citronelilo	1,5
30	34,32	NI, Compuesto M <sup>+</sup> 174	2,0
31	34,77	Acetato de geranilo	1,3
32	35,09	$\alpha$ -Copaeno	0,2
33	35,44	$\beta$ -Bourboneno	0,2
34	35,52	$\beta$ -Elemeno	1,2
35	36,25	$\beta$ -Maaleno	1,2
36	36,78	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	0,7
37	38,82	Germacreno D	0,9
38	39,12	$\beta$ -Selineno	0,4
39	39,26	$\alpha$ -Muurolo	0,4
40	39,86	-Cadineno + -Amorfeno	0,8
41	40,95	NI, Compuesto M <sup>+</sup> 234	1,0
42	42,73	NI, Compuesto M <sup>+</sup> 262	0,3
43	51,47	NI, Compuesto M <sup>+</sup> 258	0,3
44	52,25	NI, Compuesto M <sup>+</sup> 258	0,4

NI: Compuesto no identificado

En el extracto con la fracción volátil de raíz de la localidad de Abrego se encontraron octadecandien-1-ol (53,4%), hexadecanol (24,0%), octadecen-1-ol (8,0%), octadecanol (3,6%), ácido hexadecanoico (1,8%) y acetato de octadecadienilo (1,7%) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Componentes mayoritarios identificados por GC-MS en extractos etanólicos de raíz de *Ichthyothere terminalis* Abrego, Norte de Santander

Orden elución	T <sub>R</sub> (min)	Compuesto	Cantidad Relativa%
1	41,78	Espatulenol	0,5
2	41,99	Óxido cariofileno	0,1
3	43,10	Isoespatulenol	0,3
4	43,95	$\alpha$ -Eudesmol	0,3
5	48,98	Hexadecanol	24,0
6	50,64	Ácido hexadecanoico	1,8
7	51,50	Acetato de hexadecilo	0,8
8	52,58	Octadecandien-1-ol	53,5
9	52,66	Octadecen-1-ol	8,0
10	53,07	Octadecanol	3,6
11	54,85	Acetato de octadecadienilo	1,7
12	55,33	NI, compuesto oxigenado M <sup>+</sup> 198	3,2
13	55,81	NI, compuesto oxigenado M <sup>+</sup> 242	1,0
14	59,78	Diisooctil adipato	0,5
16	62,43	Diisooctil ftalato	0,4

NI: Compuesto no identificado

En comparación con reportes previos (15), estos resultados presentaron diferencias con respecto a la presencia y cantidad relativa de compuestos identificados. En hojas y tallo de *I. terminalis* de muestras de Manaos (Brasil), se reportó un contenido de  $\alpha$ -pino de 19,8% y 13,9%, lo que equivale a ocho y cinco veces el valor de las muestras de Cumaral, Colombia. Estos mismos compuestos no se encontraron en las muestras de la localidad de Abrego. Se encontraron otros compuestos con cantidades relativas significativas, como Sabineno (14,8% en hoja) y limoneno (35,8% en hoja y 20% en tallo), en cantidades aproximadamente de 30 y 18 veces más de lo encontrado en este estudio (Tabla 5). En estudios posteriores en hojas de la especie *I. terminalis*, colectadas en la localidad de Água Limpa (Brasil), se identificaron sesquiterpenolactonas (14).

En las plantas de *I. terminalis* estudiadas también se encontraron diferencias con respecto a su composición química. En las muestras de raíz de Abrego se encontró que los compuestos con mayor cantidad relativa fueron octadecandien-1-ol (53,5%), hexadecanol (24,0%), octadecen-1-ol (8,0%) y octadecanol (3,6%). En los extractos de raíz de *I. terminalis* de Cumaral los compuestos más representativos fueron citronelal (46,4%),  $\gamma$ -terpineno (6,6%), *p*-cimeno (6,4%), geraniol (5,0%), citronelol (4,6%),  $\alpha$ -pino (2,5%) y linalool (2,2%).

**Tabla 5.** Comparación de los componentes mayoritarios identificados por GC-MS en extractos etanólicos de hoja y tallos de plantas de *I. terminalis* (flor blanca) colectadas en Manaos, Brasil (25) con los extractos etanólicos de raíz Meta y Norte de Santander (Colombia)

Compuesto	Cantidad relativa %				
	Hoja (Brasil)		Tallo (Brasil)	Raíz (Colombia)	
	Manaos		Manaos	Cumaral	Abrego
Sabineno	14,8			0,4	--
$\beta$ -Pino		5,2			
$\alpha$ -Pino	19,8	8,5	13,9	2,5	--
Limoneno	35,8		20	1,1	--

La composición química de la raíz de *I. terminalis* de Cumaral resulta de gran interés debido a los compuestos encontrados que tienen efecto contra insectos vectores. Por ejemplo, se ha demostrado en ensayos in vitro y en campo, que los compuestos aromáticos como la citronela y citronelal tienen alta eficiencia como repelente contra mosquitos transmisores (18-21). Así mismo, el citronelol, un monoterpenoide acíclico natural, es empleado como perfume y también como repelente de insectos (22). Finalmente, se ha reportado que el geraniol también es un efectivo repelente de mosquitos (23).

Por otro lado, los compuestos identificados en la raíz de *I. terminalis* de Abrego que constituyen la mayor parte del extracto, son terpenos de ocho carbonos oxigenados: octadecandien-1-ol (53,5%), octadecen-1-ol (8,0%) y octadecanol (3,6%), los cuales han demostrado tener actividad antibacteriana (24). Igualmente, se ha evidenciado una actividad antioxidante del segundo compuesto principal, el hexadecanol (24,0%) (25).

Las diferencias en la composición química y cantidades relativas entre *I. terminalis* procedentes de países y localidades diferentes confirman que la composición química puede variar incluso dentro de una especie botánica. Los resultados de este estudio contribuyen al conocimiento de compuestos en plantas poco estudiadas en Colombia, los cuales podrían ser aislados como fuentes de componentes potencialmente bioactivos y como marcadores quimiotaxonómicos.

## Conclusiones

En este trabajo se reporta por primera vez el análisis fitoquímico y composición química de los extractos de raíz de *I. terminalis* de la región nordeste de Colombia, los cuales difieren con respecto a otras especies pertenecientes al género *Ichthyothere* reportadas y aún entre la misma especie de acuerdo a la localidad de procedencia. Las diferencias en la presencia de compuestos en las raíces *I. terminalis* de dos localidades de Colombia sugieren que las condiciones geobotánicas del medio como las características fisicoquímicas del suelo desempeñen un papel diferencial en la composición. La presencia de citronela, citronelol y geraniol, entre otros compuestos químicos con bioactividad, demuestran que *I. terminalis* es una planta con uso potencial como repelente. Estudios adicionales podrán determinar la efectividad como repelente de los extractos de raíz de *I. terminalis*.

## Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Fondo de Investigaciones Universitarias (FINU) de la Universidad Francisco de Paula Santander por la financiación del proyecto FINU 019-2013, para desarrollar esta investigación. Los autores agradecen el apoyo técnico de Erickson Yesid Cardona y Deisy Alejandra Cruz Laguado.

## Referencias

1. Isman, M. B. Biopesticides based on phytochemicals. In *Phytochemical biopesticides*, Koul, O.; Dhaliwal, G. S., Eds. Harwood Academic Publishers: Amsterdam, 2001; pp 1-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1201/9780203304686.ch1>.
2. Tripathi, A.; Upadhyay, S.; Bhuiyan, M.; Bhattacharya, P. R. Review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *J. Pharmacogn. Phytother.* **2009**, *1* (15), 52-63.
3. Robinson, H. Studies in the Heliantheae (Asteraceae). XXVI. New species of *Ichthyothere*. *Phytologia*. **1980**, *47*, 128-134. DOI: <http://dx.doi.org/10.5962/bh1.part.17142>.
4. Cascon, S. C.; Mors, W. B.; Tursch, B. M.; Aplin, R. T.; Durham, L. J. *Ichthyothereol* and its acetate, the active polyacetylene constituents of *Ichthyothere terminalis*/Spreng.) malme, a fish poison from the lower Amazon. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87* (22), 5237-5241. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ja00950a044>.
5. Maia, J. G. Plantas aromáticas da região Amazônica. En *Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores*; Bandoni, A. Ed.; Edufes: Vitória, Brasil, 2008.
6. Chamorro, E. R.; Zambón, S. N.; Morales, W. G.; Sequeira, A. F.; Velasco, G. A. Study of the Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography. In *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*, Salih, B.; Celikbicak, O. Eds.; Intech: New York, 2012.
7. Bilbao M. *Análisis fitoquímico preliminar*. Universidad del Quindío. Editorial Norma, Armenia 1997.
8. Lock, O. Investigación Fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. PUCP., Fondo Editorial: Lima, Perú, 1988.
9. Sanabria, A. *Análisis fitoquímico preliminar: metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia compositae*. Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). Departamento de Farmacia: Bogotá, Colombia, 1983.
10. Merck, E. *Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel*. Darmstadt. R. F: Alemania, 2000.
11. Adams, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois, USA, 2007.
12. Joulain, D.; König, W. A. The atlas of spectral data of sesquiterpenes hydrocarbons. E.B.-Verlag: Hamburgo, Alemania, 1998.
13. Linstrom, P. J.; Mallard, W. G. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. <http://webbook.nist.gov/>. [consultado 6 de Enero, 2017].
14. Stefani, R.; Batista Da Costa, F. Melampolides from *Ichthyothere terminalis* (Asteraceae, Heliantheae). *Biochem. Syst. Ecol.* **2006**, *34* (10), 757-759. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2006.05.009>.

15. Luz, A. I.; Zoghbi, M.; Maia, J. G., Volatile Constituents of *Ichthyothere terminalis* and *I. cunabi*. *J. Essent. Oil Resear.* **1997**, *9* (2), 223-225. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1997.9699465>.
16. Arámbula-Salazar, J. A.; Ibarra-Salinas, B. I.; González-Laredo, R. F.; Muñoz-Galindo, O. D.; Hernández-Vela, H. Variación estacional de compuestos fenólicos foliares en *Quercus sideroxyla* en diferentes tipos de suelo. *Madera y Bosques*, **2010**, *16* (3), 49-59. DOI: <http://dx.doi.org/10.21829/myb.2010.1631166>.
17. Mishra, B. K.; Rastogi, A.; Shukla, S. Regulatory Role of Mineral Elements in the Metabolism of Medicinal Plants. In *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* Vol. 6 (Special Issue 1: Mineral Nutrition of Medicinal and Aromatic Plants.), Naem, M.; Khan, M. N. A., Eds. Global Science Books: India, 2012; pp 1-23.
18. Jeong-Kyu, K.; Chang-Soo, K.; Jong-Kwon, L.; Young-Ran, K.; Hye-Yun, H.; Hwa-Kyung, Y. Evaluation of Repellency Effect of Two Natural Aroma Mosquito Repellent Compounds, Citronella and Citronellal. *Entomol. Resear.* **2005**, *35* (2), 117-120. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-5967.2005.tb00146.x>.
19. Zamora, D.; Klotz, S. A.; Meister, E. A.; Schmidt, J. O. Repellency of the Components of the Essential Oil, Citronella, to *Triatoma rubida*, *Triatoma protracta*, and *Triatoma recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J. Med. Entomol.* **2015**, *52* (4), 719-721. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tjv039>.
20. Yadav, N. P.; Rai, V. K.; Mishra, N.; Sinha, P.; Bawankule, D. U.; Pal, A. *et al.* A novel approach for development and characterization of effective mosquito repellent cream formulation containing citronella oil. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*. DOI: <http://dx.doi.org/786084.10.1155/2014/786084>.
21. Muller, G. C.; Junnila, A.; Butler, J.; Kravchenko, V. D.; Revay, E. E.; Weiss, R. W.; Schlein, Y., Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. *J Vector Ecol.* **2009**, *34* (1), 2-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1948-7134.2009.00002.x>.
22. Taylor, W. G.; Schreck, C. E. Chiral-phase capillary gas chromatography and mosquito repellent activity of some oxazolidine derivatives of (+)- and (-)-citronellol. *J. Phram. Sci.* **1985**, *74* (5), 534-539. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600740508>.
23. Barnard, D. R.; Xue, R. D. Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochierotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **2004**, *41* (4), 726-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.726>.
24. Okwu, D. E.; Ighodaro, B. U. GC-MS evaluation of the bioactive compounds and antibacterial activity of the oil fraction from the stem barks of *Dacryodes edulis*. *Don Lam. Int. l. Drug Dev & Res.* **2009**, *1* (1), 117-125.
25. Sethi, A.; Prakash, R.; Shukla, D.; Bhatia, A.; Pratap, R., Identification of phytochemical constituents from biologically active pet ether and chloroform extracts of the flowers of *Allamanda violacea* A.DC (Apocynaceae). *Asian J. Plant Sci. Res.* **2013**, *3* (4), 95-108.

**Article citation:**

Ortiz-Rojas, L. Y.; Chaves-Bedoya, G. Composición fitoquímica del extracto de raíz de *Ichthyothere terminalis* de dos regiones geográficas de Colombia. *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, *46* (3), 11-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n3.61865>.



<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Química Orgánica-LIDQO, Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.

<sup>3</sup>Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.

<sup>4</sup>Laboratorio de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima-Perú.

<sup>5</sup>Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Facultad de medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres, Lima-Perú

\*Autor para correspondencia: barreratommelissa@gmail.com

Recibido: 10 de Enero de 2017. Aceptado: 29 de Marzo de 2017.

## Synthesis of acyl-hydrazone from usnic acid and isoniazid and its anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity

### Abstract

Compound usnic acid (**1**), isolated from lichen *Evernia prunastri* (Cajamarca-Peru) and the synthesis and characterization of its acyl-hydrazone (**2**), from the condensation reaction between usnic acid and isoniazid in an ethanol solution under reflux, giving an overall yield of 95%, were evaluated. Both compounds were evaluated and compared with isoniazid according to its anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity based on the tetrazolium microplate assay (TEMA). Compound **1** had MIC (minimal inhibitory concentration) value of 16.0 µg/mL in each test of H37Rv (susceptible type), TB DM 97 (resistant wild type) and MDR DM 1098 (multi drug resistances type) strains. In similar tests, compound **2** MIC values were 2.0, 64.0 and 64.0 µg/mL respectively.

**Keywords:** *Evernia prunastri*, condensation reaction, TEMA, MIC.

## Síntesis de acil-hidrazona a partir del ácido úsnico e isoniazida y su actividad anti-*Mycobacterium tuberculosis*

### Resumen

Se evaluó el ácido úsnico (**1**), aislado del líquen *Evernia prunastri* (Cajamarca-Perú), producto natural conocido por sus actividades biológicas, y, del mismo modo, se evaluó la síntesis de su derivado acil-hidrazona (**2**), obtenido a partir de una reacción de condensación entre el ácido úsnico y la isoniazida en solución etanólica a reflujo, con un rendimiento global de 95%. Ambos compuestos fueron evaluados y comparados con la isoniazida según su actividad anti-*Mycobacterium tuberculosis* basada en el ensayo de susceptibilidad mediante el método TEMA. Los resultados mostraron que el compuesto **1** presenta valores de MIC de 16,0 µg/mL frente a las cepas H37Rv, TB DM 97 y MDR DM 1098, mientras que el compuesto **2** presenta valores de MIC de 2,0; 64,0 y 64,0 µg/mL respectivamente.

**Palabras clave:** *Evernia prunastri*, reacción de condensación, TEMA, MIC.

## Síntese de acilhidrazona a partir de ácido úsnico e isoniazida e sua atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*

### Resumo

Foi avaliado o ácido úsnico (**1**), um produto natural conhecido pelas suas atividades biológicas, isolado a partir do líquen *Evernia prunastri* (Cajamarca-Peru), assim mesmo foi avaliada a síntese do seu derivado, a acil-hidrazona (**2**), obtido a partir de uma reação de condensação com refluxo entre o ácido úsnico e a isoniazida em solução etanólica, com um rendimento global de 95%. A atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* de ambos compostos foi avaliada e comparada com a isoniazida mediante testes de sensibilidade obtidos pelo método TEMA. Os resultados mostraram que o composto **1** apresenta o valor de MIC de 16,0 µg/mL contra variedades H37Rv, TB DM 97 e MDR DM 1098; enquanto que para o composto **2** os valores de MIC são de 2,0; 64,0 e 64,0 µg/mL, respectivamente.

**Palavras-Chave:** *Evernia prunastri*, reação de condensação, TEMA, MIC.

## Introduction

Tuberculosis (TB), caused by the bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, is a major public health problem that annually kills approximately 3 million people worldwide. It is worsened if there is co-infection with HIV (1). Approximately, one third of the world's population is infected with latent TB (1, 2). The therapy against tuberculosis is based on the use of combined drugs such as rifampicin, isoniazid (INH), and pyrazinamide, which are also employed as components of currently applied multidrug therapy of TB (3). Generally, MDR-TB includes the strains resistant to at least isoniazid and rifampin, considered as the more efficient first-line drugs against TB. The occurrence of mutations within several genes is responsible for the MDR-phenotype. For example, in the case of INH resistance, mutations within *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, genes are involved (4).

Despite the global availability of drugs against tuberculosis, there are still some issues to address: the long duration of the treatment, the serious side effects, and the development of multidrug-resistant strains (5, 6). This reveals the urgent need to identify novel, safe, and effective candidates for the determination of an optimized and efficient drug against the *M. tuberculosis*.

Over the last decade, there has been extensive research on antibacterial compounds from natural products, since they are considered to be the major source of active metabolites. These may provide lead structures for the development of new drugs (7), for example, usnic acid (UA) appears to be a promising medical application. Usnic acid is a yellowish, highly functionalized dibenzofuran metabolite found in various lichen genera distributed in species of *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evernia* and *Parmotrema*. It can exist as (+) and (-) enantiomers, but most of its biological activity is attributed to the (+) enantiomer (8, 9). Usnic acid displays a wide range of multiple biological effects, including: anti-bacterial, anti-parasitic, anti-viral, anti-mycotic, anti-protozoal, anti-proliferative, anti-inflammatory, anti-pyretic, and cytotoxicity against human cancer cell lines (10, 11).

Furthermore, earlier studies reveal that (+)-usnic acid exhibits activity against *M. tuberculosis*, showing a MIC value of 32 µg/mL, which was not considered potent enough (12). Considering the fact that the functional groups found within the molecule make of usnic acid a good target for structural modifications (2), a reaction between UA and INH was suggested in order to evaluate the enhancement or not of its activity against *M. tuberculosis*.

In this context, this research presents the synthesis and characterization of an acyl-hydrazone (2) [(*R,E*)-*N'*-(1-(6-acetyl-3,7,9-trihydroxy-8,9b-dimethyl-1-oxo-1,9b-dihydrodibenzo[b,d]furan-2-yl)ethylidene)isonicotinohydrazide], obtained from a condensation reaction between usnic acid (1) and isoniazid, and the study of its anti-mycobacterial activity into *M. tuberculosis* strains.

## Materials and methods

In general, all solvents and reagents (Acros Organics or Sigma Aldrich) were used without prior purification. The isolation and purification were monitored by thin layer chromatography (TLC) on silica gel plate (Merck 60 F<sub>254</sub>), preparative chromatography (Merck 60 F<sub>254</sub>), and by column chromatography using silica gel (Gel 60 silica particle size 0.063-0.200 mm).

Compounds 1 and 2 were analyzed and characterized in CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>, respectively, by <sup>1</sup>H-NMR 300 MHz, <sup>1</sup>H-NMR 600 MHz and <sup>13</sup>C-NMR 150 MHz with a Varian Unity Inova AS600 spectrometer. The notations used for the spectral analysis are: s (singlet), d (doublet), m (multiplet). Chemical shifts are reported in δ (ppm) using tetramethylsilane (TMS) as the internal standard. The determination of the exact molecular weights was performed by high resolution mass spectrometry (HRMS) on an Agilent Technologies Model 6210 LC-MSD-TOF (Time-of-Flight mass spectrometer) instrument. The molecular ions were protonated [M+H]<sup>+</sup> or [M-H]<sup>-</sup> for the confirmation of their empirical formula. Infrared spectra were recorded on a JASCO FT/IR-410 spectrophotometer. The optical rotation was measured using a JASCO P-1010 polarimeter.

The *M. tuberculosis* isolates: H37Rv, TB DM97, and MDR DM1098 were obtained from Cayetano Heredia University Hospital. Their suspensions were prepared in 10% (v/v) Tween 80 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) so that their turbidities matched that of the McFarland N°1 turbidity standard (approximately 3 x 10<sup>7</sup> CFU/mL). Therefore, suspensions were diluted 1:25 in 7H9 broth (4.7 g of Middlebrook 7H9 broth base [Difco, Detroit, Mich.], 20 mL of 10% glycerol, 1 g of Bacto Casitone [Difco], 880 mL of distilled water, 100 mL of oleic acid, albumin, dextrose, and catalase [Remel, Lenexa, Kans.]) (13,14).

## Extraction, isolation, and elucidation of usnic acid

The branched thallus of *Evernia prunastri* were collected at Porcon farm, located 30 km from the city of Cajamarca-Peru and identified by Dr. Luis Dávila of National University of Cajamarca, Cajamarca, Peru.

The branched dried thallus of *Evernia prunastri* (100 g) was crushed into a powder and extracted with an increasing polarity order of solvents using hexane (72 h (3x)), ethyl ether (72 h (x2)), chloroform (72 h (2x)), ethyl acetate (72 h (x2)), methanol (72 h (3x)), and water (72 h (3x)) at room temperature. The ethyl ether extract (4.8 g) was separated using repeatedly flash column chromatography with hexane/ethyl acetate (7:3) and hexane/toluene/ethyl acetate (85:5:15), obtaining four fractions A, B, C and D. Fraction D was cooled at room temperature then filtered whereby a precipitate was obtained as a greenish yellow solid. This precipitate was separated out and recrystallized in ethanol 99% (v/v), from which the major compound was obtained as yellow crystals and identified as usnic acid (2.8 g), confirmed by <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectrums and by comparison with reported data (12).

## Synthesis of acyl-hydrazone obtained from usnic acid and isoniazid

Usnic acid (500 mg, 1.45 mmol, 1 eq) and isoniazid (250 mg, 1.74 mmol, 1.2 eq) were added to a solution of 50 mL of absolute ethanol. The solution was stirred and heated at reflux for 12 h. The solution was cooled at room temperature and stored in a refrigerator for two days. The precipitate formed was filtered and dried in an oven at 25 °C for 24 h. The final product (acyl-hydrazone) was obtained as orange crystals (15).

### Biological activity evaluation

The activity of usnic acid, isoniazid, and their acyl-hydrazone against susceptible (H37Rv), resistant wild type (DM 97) and multidrug resistance (DM 1098) *M. tuberculosis* strains were tested by tetrazolium microplate assay (TEMA), which uses tetrazolium bromide [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.) as a rapid, simple, and low-cost qualitative method to determine the antibiotic susceptibility (11). The assay was performed in duplicate (two plates). The procedure is described below (13, 14).

### Preparation of culture inoculum

Cultivation of *M. tuberculosis* was performed in Middlebrook 7H9 broth during four weeks. The inoculation of the strains was achieved by using a sterile loop into a glass bead tube with 100  $\mu$ L of mix-Tween and mixed in a vortex for 2 min. Three mL of 10% (w/w) Tween 80 was added and stirred in a vortex for 20 s. The supernatant was transferred to a glass tube without beads. The turbidity was adjusted to McFarland N°1 with a mix-Tween solution. The McFarland N°1 strain was combined with Middlebrook 7H9 broth medium (12 mL of 7H9 + 0.5 mL of the strain) and diluted 1:25 in a Falcon tube.

### Plate preparation and inoculation of drug and strain

Sterile water (200  $\mu$ L) was added to all outer wells of sterile 96-well plates (Falcon 3072; Becton Dickinson, Lincoln Park, N. J.). Middlebrook 7H9 broth (100  $\mu$ L) was added to the wells in rows B to G in columns 3 to 11 (labeled as commercially stamped on the plates). Drugs solutions (usnic acid, isoniazid and their acyl-hydrazone) (100  $\mu$ L) were added to wells in columns 1 and 2; each two rows correspond to a different drug solution.

By using a multichannel pipette, 100  $\mu$ L of solution was transferred from column 2 to column 3. The drug solutions were serially diluted 1:2 in consecutive columns through column 10, where 100  $\mu$ L of excess medium was discarded. Final drug concentration ranges were 64 to 0.12  $\mu$ g/mL. 100  $\mu$ L of the diluted 1:25 strain was added to the wells in rows B to G in columns 1 to 11. The wells in column 11 served as inoculum-only controls. The plates were sealed with parafilm and then incubated at 37 °C for five days. Fifty microliters of a 1:1 mixture of the tetrazolium-Tween 80 mixture was added to well B11. The plates were reincubated at 37 °C for 12 h.

The following day, if well B11 turned purple, tetrazolium-Tween 80 was added to all wells and the color was recorded at 24 h. If well B11 remained yellow, the plates were incubated for another 24 h, after which tetrazolium-Tween 80 solution was added to well C11 before the plate was incubated for another 24 h. If well C11 remained yellow, incubation was continued and tetrazolium-Tween 80 solution was added to wells D11, E11, F11, and G11 on days 9, 11, 13, and 15, respectively. A yellow color in the well was interpreted as no growth, and a purple color was scored as growth. The MIC was defined as the lowest drug concentration, which prevented a color change from yellow to purple.

## Results and discussion

### Extraction, isolation and elucidation of usnic acid

Usnic acid (2.8 g) was obtained as yellow crystals from dried thallus of lichen *Evernia prunastri* (100 g), using repeatedly flash column chromatography with hexane/ethyl acetate (7:3) and hexane/toluene/ethyl acetate (85:5:15). The IR spectrum showed bands at 2929 (CH-stretching), 1687 (elongation of the carbonyl group), 1628 (C=C, enol ether), 1540, 1455, 1421  $\text{cm}^{-1}$  (aromatic ring). It should be mentioned that a wide band was present between 3500 and 2600  $\text{cm}^{-1}$ , due to the many hydrogen bonds present in the solid state.

The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum shows characteristic signals at  $\delta$  13.31 and  $\delta$  11.02 ppm corresponding to the hydroxyl groups C<sub>8</sub>-OH and C<sub>10</sub>-OH respectively;  $\delta$  5.97 ppm corresponding to the H-4 from the double bond; finally  $\delta$  2.67, 2.66, 2.10; and 1.75 ppm corresponding to the methyl substituents. The hydroxyl group C<sub>3</sub>-OH appears at 18.84 ppm (Figure 1).

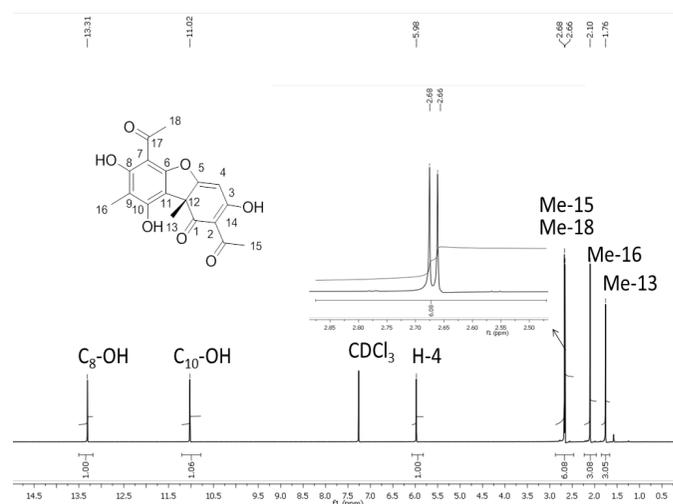


Figure 1.  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectrum of compound 1

Usnic Acid:  $[\alpha]_D^{25}$  (c = 0.7,  $\text{CHCl}_3$ ) = +451. R<sub>f</sub> = 0.32 (hexane/ethyl acetate 7:3).  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.31 (s, 1H, OH), 11.02 (s, 1H, OH), 5.97 (s, 1H, CCH), 2.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.75 ppm (s, 3H, CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 201.9 (CO), 200.4 (CO), 198.2 (CO), 191.8 (COH), 179.5, 164.0, 157.6, 155.3, 109.4, 105.3, 104.1, 101.6, 98.5, 59.2 (C<sub>dibenzofuran</sub>), 32.3 (COCH<sub>3</sub>), 31.4 (COCH<sub>3</sub>), 28.1 (CH<sub>3</sub>), 7.7 ppm (CH<sub>3</sub>). **ESI-HRMS**: m/z calculated for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>O<sub>7</sub> [M - H]<sup>-</sup>: 343.102; found: 343.100.

### Synthesis of acyl-hydrazone obtained from usnic acid and isoniazid

The synthesis of the acyl-hydrazone was obtained with an overall yield of 95% (1.38 mmol) as orange crystals (Figure 2). The IR spectrum showed bands at 3415 (tension due to N-H), 2925 (CH-stretching), 1706 (tension due to carbonyl group), 1630 (C=N; C=C, enol ether, aromatic ring), 1549, 1362, 1220  $\text{cm}^{-1}$ . It should be noted that the NH group at 3415  $\text{cm}^{-1}$  mask the signals of the OH groups present in the molecule.

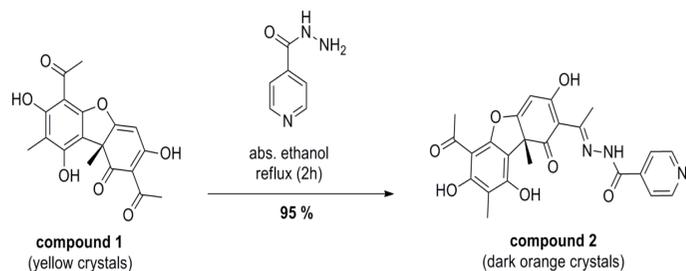


Figure 2. Synthesis of compound 2

The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum shows characteristic signals of usnic acid and the corresponding signals of the protons belonging to the pyridine group, which appear upfield (Figure 3). The signals at  $\delta$  14.80,  $\delta$  13.40, and  $\delta$  12.13 ppm correspond to the hydroxyl groups  $\text{C}_3\text{-OH}$ ,  $\text{C}_8\text{-OH}$ , and  $\text{C}_{10}\text{-OH}$  respectively;  $\delta$  8.84 ppm, H-22, and H-23;  $\delta$  7.93 ppm, H-21 and H-24;  $\delta$  5.95 ppm, H-4;  $\delta$  3.45, NH. Signals at  $\delta$  2.71, 2.65, 1.98 and 1.69 ppm correspond to the methyl substituents.

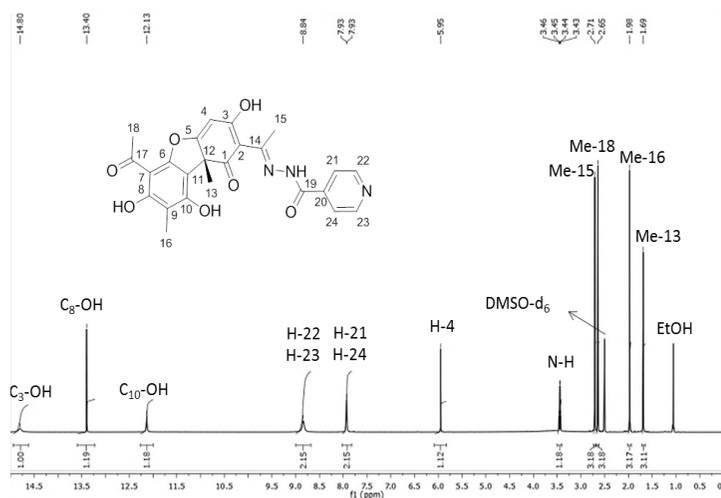


Figure 3.  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) spectrum of compound 2

The comparison of  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of usnic acid and acyl-hydrazone revealed that the chemical shift of  $\text{C}_3\text{-OH}$  is due to the presence of the imine group in the structure; the presence of this amine group also influences the electron density of the methyl group (Me-15), which appears shifted to downfield ( $\delta$  2.68 to  $\delta$  2.71).

Acyl-hydrazone:  $[\alpha]_D^{23}$  ( $c = 0.25$ , acetone) = +205.6.  $R_f = 0.35$  (hexane/toluene/ ethyle acetate/methanol 4:1:5:1).  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 14.80$  (s, 1H, OH), 13.40 (s, 1H, OH), 12.13 (s, 1H, OH), 8.84 (m, 2H, 2CH), 7.93 (d, 2H, 2CH), 5.95 (s, 1H, CCH), 3.45 (m, 1H, NH), 2.71 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.65 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.98 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.69 ppm (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 201.0$  (CO), 197.5 (CO), 188.7 (COH), 173.6 (CO), 170.3 (CCO), 163.4 (CO), 157.7 (CO), 155.9 (CN), 149.4 (CN)<sub>pyr</sub>, 122.2 (CCN)<sub>pyr</sub>, 106.5 (CCC), 105.2 (CCC), 102.4 (CCHC), 101.0 (CCC), 100.9 ppm (CCC).  $\text{ESI}^+\text{-HRMS}$ :  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_7$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : 464.1452; found: 464.1475.

## Biological activity against *M. tuberculosis*

The activity of isoniazid, usnic acid, and their acyl-hydrazone against susceptible (H37Rv), resistant wild type (DM 97) and multidrug resistances (DM 1098) *M. tuberculosis* strains were evaluated (Figure 4). The tetrazolium microplate assay was performed in duplicate (two rows) based on the methodology already mentioned (see Materials and methods part). The MIC values obtained by compound 1 provide a better prospect to be potentially active compared to compound 2, the results are shown in Table 1.

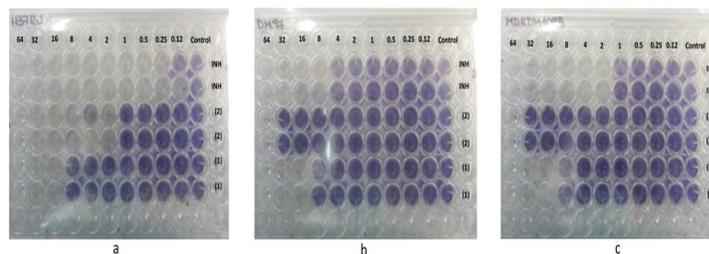


Figure 4. Biological activity of (1), (2) and isoniazid (INH) against (a) susceptible (H37Rv), (b) resistant wild type (DM 97), and (c) multi drug resistances (DM 1098) *M. tuberculosis* strains

Table 1. Antimycobacterial activity of INH, compound 1, and compound 2

Strains (number of strains tested)	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	INH <sup>a</sup>	Compound 1 <sup>b</sup>	Compound 2 <sup>c</sup>
<i>M. tuberculosis</i>			
H37Rv-susceptible	0.25	16.00	2.00
DM 97-resistant wild type	8.00	16.00	64.00
MDRDM 1098-multidrug resistance	2.00	16.00	64.00

<sup>a</sup>INH = Isoniazid. <sup>b</sup>Compound 1 = Usnic acid. <sup>c</sup>Compound 2 = Acyl-hydrazone

As it is shown in Table 1, acyl-hydrazone does not ameliorate the antimycobacterial activity of usnic acid for DM 97-resistant wild type, nor of H37Rv-susceptible strains, but, contrastingly, acyl-hydrazone showed an enhancement of its antimycobacterial activity, as compared to usnic acid on H37Rv-susceptible.

## Conclusions

The synthesis of compound 2 (acyl-hydrazone) was achieved by a condensation reaction using commercial isoniazid and usnic acid, isolated from lichen *Evernia prunastri*, giving an overall yield of 95% (w/w). The isolation of usnic acid was performed using standard protocols of extractions and column chromatographic purifications. Their chemical structures were elucidated using 1D NMR spectroscopy and mass spectrometry, thus corroborating spectroscopic data reported in the literature (15-18).

According to the results obtained by TEMA method, usnic acid (**1**) exhibited MIC value of 16.0 µg/mL for each test of H37Rv, TB DM 97, and MDR DM 1098 strains. Instead, the corresponding acyl-hydrazone (**2**) exhibited MIC values of 2.0 µg/mL against H37Rv, and 64.0 µg/mL against resistant strain and multidrug resistance from *M. tuberculosis*.

The MIC values obtained by compound **1** provide a better prospect to be potentially active as compared to compound **2**. However, both compounds exhibit less activity than isoniazid. Apparently, compound **2** does not meet initial expectations of increasing sensitivity on TB strains. However, these are preliminary *in vitro* results, and further *in vivo* studies should be carried out to confirm its antitubercular activity.

## References

1. Sheen, P.; Lozano, K.; Gilman, R. H.; Valencia, H. J.; Loli, S.; Fuentes, P. *et al.* pncA gene expression and prediction factors on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. **2013**, *93* (5), 515-522. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.03.005>.
2. Bekker, O. B.; Sokolov, D. N.; Luzina, O. A.; Komarova, N. I.; Gatilov, Y. V.; Andreevskaya, S. N. Synthesis and activity of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid derivatives containing 1,3-thiazole cycle against *Mycobacterium tuberculosis*. *Med. Chem. Res.* **2015**, *24* (7), 2926-2938. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1348-2>.
3. Rodrigo, L.; Tozatti, M. G.; de Oliveira Salloum, A. I.; Crotti, A. E. M.; Silva, M. L. A.; Gimenez, V. M. M. *et al.* Antimycobacterial activity of *Usnea steineri* and its major constituent (+)-usnic acid. *Afr. J. Biotechnol.* **2012**, *11* (20), 4636-4639. DOI: <https://doi.org/10.5897/ajb11.3551>.
4. Ali, I. F. A.; Babak, F.; Fazlollah, M. S.; Nematollah, J. J. Rapid detection of MDR-*Mycobacterium tuberculosis* using modified PCR-SSCP from clinical Specimens. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, *4* (1), 165-170. DOI: <https://doi.org/10.12980/apjtb.4.2014c1186>.
5. Solis, L.; Coronel, J.; Rueda, D.; Gilman, R. H.; Sheen, P.; Zimic, M. Evaluation of a lens-free imager to facilitate tuberculosis diagnostics in MODS. *Tuberculosis (Edinb)*. **2016**, *97*, 26-32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.12.001>.
6. Horvati, K.; Bacsá, B.; Kiss, E.; Gyulai, G.; Fodor, K.; Balka, G. *et al.* Nanoparticle encapsulated lipopeptide conjugate of antitubercular drug isoniazid: *in vitro* intracellular activity and *in vivo* efficacy in a Guinea pig model of tuberculosis. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25* (12), 2260-2268. DOI: <https://doi.org/10.1021/bc500476x>.
7. Luzina, O. A.; Sokolov, D. N.; Pokrovskii, M. A.; Pokrovskii, A. G.; Bekker, O. B.; Danilenko, V. N. *et al.* Synthesis and biological activity of usnic acid enamine derivatives. *Chem. Nat. Compd.* **2015**, *51* (4), 646-651. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10600-015-1376-7>.
8. Segatore, B.; Bellio, P.; Setacci, D.; Brisdelli, F.; Piovano, M.; Garbarino, J. A. *et al.* *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. *Phytomedicine*. **2012**, *19* (3-4), 341-347. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.10.012>.
9. Lira, M. C. B.; Ferraz, M. S.; Silva, D. G. V. C.; Cortes, M. E.; Teixeira, K. I.; Caetano, N. P. *et al.* Inclusion complex of usnic acid with β-cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. *J. Inclusion Phenom. and Macrocyclic Chem.* **2009**, *64* (3-4), 215-224. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10847-009-9554-5>.
10. Backor, M.; Klemova, K.; Backorova, M.; Ivanova, V. Comparison of the phytotoxic effects of usnic acid on cultures of free-living alga *Scenedesmus quadricauda* and aposymbiotically grown lichen photobiont *Trebouxia erici*. *J. Chem. Ecol.* **2010**, *36* (4), 405-411. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9776-4>.
11. Brisdelli, F.; Perilli, M.; Sellitri, D.; Piovano, M.; Garbarino, J. A.; Nicoletti, M. *et al.* Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an *in vitro* study. *Phytother. Res.* **2013**, *27* (3), 431-437. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.4739>.
12. Ingólfssdóttir, K. Usnic Acid. *Phytochemistry*. **2002**, *61*, 729-736. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00383-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00383-7).
13. Franzblau, S. G.; Witzig, R. S.; McLaughlin, J. C.; Torres, P.; Madico, G.; Hernandez A. *et al.* Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36* (2), 362-366.
14. Caviedes, L.; Delgado, J.; Gilman, R. H. Tetrazolium Microplate Assay as a Rapid and Inexpensive Colorimetric Method for Determination of Antibiotic Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40* (5), 1873-1874. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.40.5.1873-1874.2002>.
15. Natic, M.; Tesic, Z.; Anđelkovic, K.; Brćeski, I.; Radulovic, S.; Manic, S. *et al.* Synthesis and Biological Activity of Pd (II) and Cu (II) Complexes with Acylhydrazones of Usnic Acid. *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.* **2004**, *34* (1), 101-113. DOI: <https://doi.org/10.1081/SIM-120027320>.
16. Lane, C. A.; Green T. K. Usnic Acid and the Intramolecular Hydrogen Bond. A Computational Experiment for the Organic Laboratory. *J. Chem. Educ.* **2006**, *83* (7), 1046. DOI: <https://doi.org/10.1021/ed083p1046>.
17. Castro, O. N. Aislamiento del ácido úsnico de *Flavoparmelia caperata* y su determinación cuantitativa por espectroscopía UV, en diez líquenes. *Rev. Soc. Quím.* **2010**, *74* (4), 389-399.
18. Kutney, J. P.; Sanchez, I. H. Studies in the usnic acid series. I. The condensation of (+)-usnic acid with aliphatic and aromatic amines. *Canadian J. Chem.* **1976**, *54* (17), 2795-2803. DOI: <https://doi.org/10.1139/v76-395>.

### Article citation:

Barrera-Tomas, M.; Tomas-Chota, G. E.; Sheen-Cortavarría, P.; Fuentes-Bonilla, P.; Inocente-Camones, M. A.; Santiago-Contreras, J. C. Synthesis of acyl-hydrazone from usnic acid and isoniazid and its activity anti-*Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, *46* (3), 17-21. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n3.61980>.



## Alcaloides aporfínicos con actividad antituberculosa aislados de *Ocotea discolor* Kunth (Lauraceae)

### Resumen

La tuberculosis causa miles de muertes a nivel mundial y, actualmente, los fármacos usados no son suficientes y en ocasiones son obsoletos para su tratamiento. Por tanto, se hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos que ayuden a combatirla. Se evaluó la actividad antituberculosis de los alcaloides ocoxilonina (1), ocoteína (2), dicentrina (3) y 1,2-metilendioxi-3, 10,11-trimetoxiaporfina (4), aislados de la madera de *Ocotea discolor*. Las estructuras fueron identificadas por medio del análisis de los datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear (NMR 1D – <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>2</sup>D – COSY, HSQC y HMBC), espectros de masas y comparación con datos de la literatura. Todos los compuestos aislados demostraron actividad antituberculosa, con un rango de variación en la concentración mínima inhibitoria entre 140 y 310 μM, siendo la ocoteína (2) la más activa contra la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, datos espectroscópicos, Ocoteína.

## Aporphine alkaloids with antitubercular activity isolated from *Ocotea discolor* Kunth (Lauraceae)

### Abstract

Tuberculosis disease causes thousands of deaths worldwide and, currently, the used drugs are either not enough or obsolete for its treatment. Therefore, new compounds that combat this disease are being sought. Thus, the antituberculosis activity of the alkaloids ocoxilonine (1), ocoteine (2), dicentrine (3) and 1,2-methylenedioxy-3,10,11-trimethoxy aporphine (4), isolated from *Ocotea discolor* wood was evaluated. Their structures were identified by analysis of nuclear magnetic resonance spectroscopic data (NMR 1D – <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>2</sup>D – COSY, HSQC and HMBC), mass spectra, and comparison with literature data. All the isolated compounds showed antituberculosis activity, with a variation range in the minimum inhibitory concentration between 140 to 310 μM, being ocoteine (2) the most active compound against the virulent strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, spectroscopic data, Ocoteine.

## Alcalóides aporfínicos com atividade antituberculosa isolados de *Ocotea discolor* Kunth (Lauraceae)

### Resumo

Devido a que a tuberculose provoca milhares de mortes em todo o mundo e a que, atualmente os medicamentos usados são inadequados e obsoletos para o tratamento desta doença, é preciso buscar novos compostos que ajudem a combatê-la. Assim, foi avaliada a atividade antituberculosis dos alcaloides ocoxilonina (1), ocoteína (2), dicentrina (3) y 1,2-metilendioxi-3,10,11-trimetoxiaporfina (4), isolados a partir da madeira de *Ocotea discolor*. Estas estruturas foram identificadas pela elucidação dos dados espectroscópicos (NMR 1D – <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>2</sup>D – COSY, HSQC e HMBC), espectros de massas e por comparação com os dados da literatura. Todos os compostos isolados demonstraram atividade antituberculosis, com um intervalo de variação na concentração inibitória mínima entre 140 e 310 μM, sendo a ocoteína (2) o composto mais ativo contra a variedade virulenta *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

**Palavras-Chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, dados espectroscópicos, Ocoteína.

## Introducción

La tuberculosis (TB) es una infección bacteriana causada por especies pertenecientes al complejo de *Mycobacterium tuberculosis*. Actualmente constituye un problema de salud pública a nivel mundial, con 10,4 millones de nuevos casos y 1,4 millones de muertes, reportados para el 2015 ante la Organización Mundial de la Salud (1). Los medicamentos anti-TB usados actualmente son poco eficientes e involucran cuatro fármacos diferentes en su tratamiento, por un periodo de 6 meses, razón por la cual se han hecho esfuerzos para desarrollar medicamentos anti-TB más efectivos.

Así mismo, la infección con *M. tuberculosis*, resistente a los medicamentos anti-TB, provoca un aumento del riesgo del fracaso terapéutico, un aumento del tiempo y costo del tratamiento, así como de sus efectos secundarios. Aunque la bedaquilina, aprobada por la FDA en 2013, se prescribe para el tratamiento de la tuberculosis multi-drogorresistente, este medicamento produce serios efectos secundarios como síndrome QT prolongado, disfunción del hígado y aumento en el riesgo de muerte (2), razones que demuestran la falta de desarrollo de nuevos agentes anti-TB que actúen a través de nuevos mecanismos de acción para garantizar un régimen efectivo en la próxima década (3).

Los productos naturales han sido una fuente importante de nuevos esqueletos bioactivos para tratar la TB, por ejemplo, las manzaminas, pleuromutilinas e hirsutelonas son utilizados en el desarrollo de medicamentos anti-TB (4). Del mismo modo, estudios previos sobre alcaloides aporfínicos aislados de especies de Lauraceae como *Ocotea macrophylla* (5) y *Rhodostemonodaphne crenaticupula* (6) han evidenciado una tendencia de actividad anti-TB en estas especies. El género *Ocotea* es uno de los más estudiados dentro de la familia Lauraceae, siendo fuente de terpenos (7-9) neolignanicos y lignanos (10-14), alcaloides aporfínicos (15-17) y bencilisoquinolínicos (18, 19), además de compuestos fenólicos y flavonoides (20-22). Los estudios de actividad biológica del género han demostrado que estas especies poseen efectos antimicrobianos (23-25), antiparasitarios (26), antitumorales y citotóxicos (19, 27, 28); estas últimas debido a las propiedades de los compuestos aislados en la inhibición de la topoisomerasa I (29).

Como ya se mencionó antes, entre las moléculas derivadas de productos naturales que han mostrado tener actividad antituberculosa prometedora, se destacan los alcaloides y, dentro de ellos, los aporfínicos (30). Como el género *Ocotea* ha reportado ser productor de este tipo de alcaloides, se escogió la especie *Ocotea discolor* para su aislamiento y su posterior medición de actividad antituberculosa. En Colombia, la especie se encuentra en la cordillera central, a alturas mayores a 1500 m s. n. m (31).

Debido a que no se ha publicado hasta el momento ningún reporte fitoquímico o de actividad biológica para esta especie, se describen aquí los compuestos de tipo alcaloide aporfínico aislados de la madera y se presenta su efecto en el crecimiento de la bacteria virulenta *M. tuberculosis* H37Rv.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

La madera de *Ocotea discolor* fue colectada en octubre de 2011, en la vía Duitama-Charalá (Colombia). La especie fue determinada por el biólogo Adolfo Jara, del Herbario Nacional Colombiano. Un espécimen se depositó en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales en la Universidad Nacional de Colombia con el número COL 566243.

### Extracción y Aislamiento

La madera seca y molida de *Ocotea discolor* (1160 g) fue extraída con etanol al 96% (v/v) a temperatura ambiente. La evaporación del solvente se hizo por destilación a presión reducida quedando un extracto de 41,7 g. Una parte del extracto (30 g) fue fraccionada por cromatografía flash (FC) en silica gel 60 (Macherey-Nagel, Alemania) y eluido con AcOiPr-MeOH-H<sub>2</sub>O (91:8:1) hasta 100% (v/v) MeOH, dando 12 fracciones. La fracción 8 (514 mg) fue purificada por FC con CHCl<sub>3</sub>-MeOH (98:2), para obtener el compuesto 1 (12 mg). La fracción 9 (370 mg) fue purificada por sucesivas FC con CHCl<sub>3</sub>-MeOH (9:1-95:5), donde se obtuvo el compuesto 2 (7 mg). De la fracción 11 (1500 mg), por columnas sucesivas con la fase móvil AcOiPr-MeOH en diferentes proporciones, se obtuvieron los compuestos 3 (30 mg) y 4 (20 mg). Todos los solventes utilizados fueron grado analítico de la casa Merck, Alemania.

### Procedimiento experimental general

La rotación óptica fue medida en un polarímetro Bellingham & Stanley ADP440+. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, así como los espectros 2D (COSY, HMQC y HMBC) fueron tomados en un equipo Bruker Avance™ 300 operado a 300 MHz para <sup>1</sup>H y 75 MHz para <sup>13</sup>C. Los desplazamientos químicos están en δ (ppm) y los experimentos fueron registrados a temperatura ambiente en CDCl<sub>3</sub> (Merck, Alemania). La cromatografía en capa delgada (TLC) fue hecha en placas de silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Alemania); los compuestos se visualizaron con el reactivo de Dragendorff, vapores de yodo y luz UV (32).

### Ensayo de actividad anti-TB

Se adaptó del ensayo de microplato de 96 pozos con resazurina (REMA), protocolo publicado por Martin *et al.* (33). La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 9360) que se usó como referencia estándar para estudios de investigación se cultivó a partir de criopreservado en 10 mL de medio líquido Middlebrook 7H9 (BD). Este fue suplementado con 0,2% (v/v) glicerol (Sigma), 0,05% (v/v) Tween® 80 (Sigma) y 10% (p/v) albumina, dextrosa y catalasa (ADC, BD) por incubación a 37 °C en tubos falcons estériles de 50 mL con agitación esporádica, durante 3-4 semanas. Posteriormente, se cambió a medio líquido en las mismas condiciones.

Se preparó una solución stock de cada compuesto en DMSO (Sigma) a una concentración de 100 mg/mL. Los compuestos fueron probados en cada microplato por diluciones seriadas empezando desde 100 µg/mL con Middlebrook 7H9 (BD), suplementado con 0,2% de glicerol (Sigma), 0,05% de Tween® (Sigma) y 10% de OADC (BD). Se utilizó agua estéril en los pocillos circundantes para evitar la evaporación del medio líquido; el ensayo se realizó por duplicado. El cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 9360) creció en medio Middlebrook 7H10 (BD) a 37 °C, y antes del ensayo se realizó un paso del cultivo en medio líquido Middlebrook 7H9. El antibiótico rifampicina (Sigma) fue usado como control positivo. La concentración mínima inhibitoria fue determinada visualmente como la mínima concentración donde la bacteria no creció.

## Resultados y discusión

Los compuestos **1-4** fueron obtenidos como sólidos cafés amorfos, los cuales generaron un color naranja en TLC al revelarlos con el reactivo de Dragendorff, lo que sugiere la presencia de alcaloides. Los espectros de RMN 1D poseen una amplia similitud lo que sugiere una serie de compuestos estructuralmente relacionados. El espectro RMN <sup>1</sup>H de **2** mostró hidrógenos de tipo aromático y alifático; las señales en δ 3,20- 3,34 (1H, m, H-6a), δ 3,07-3,20 (1H, m, H<sub>1</sub>-5), δ 2,46-2,55 (1H, m, H<sub>2</sub>-5), δ 3,11 (1H; dd; *J*= 4,3 y 14,0; H<sub>1</sub>-7) y δ 2,74 (1H, d, *J*=14,0 Hz, H<sub>2</sub>-7), corresponden a señales típicas del núcleo aporfínico (17, 33), como se muestra en la Figura 1.

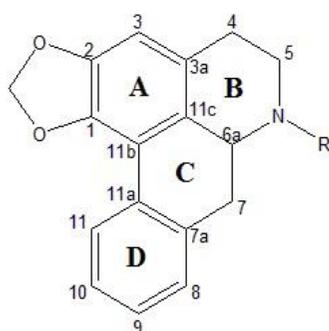


Figura 1. Núcleo aporfínico

Adicionalmente, se observaron las señales entre: δ 3,90-4,10 (s, 9H) correspondientes a 3 grupos metoxi, algunos multipletes de grupos metilenos en δ 2,77-3,20; dos hidrógenos aromáticos en δ 7,60 (s, H-8) y δ 6,77 (s, H-11), junto con dos singletes típicos del grupo metilendioxi en δ 5,93 (s, Ha) y δ 6,08 (s, Hb) (19). La correlación en el experimento COSY de H-4 con Hb-5 y las correlaciones en HMBC de H-4 con C-3 y C-3a, Hb-5 con C-3a, Hb-7 con C-11c, H-8 con C-10 y C-11, H-11 con C-7a y C-9 permiten construir cuatro anillos de seis miembros, dos aromáticos (A y D) y dos no aromáticos (B y C) (33-34), que en conjunto permiten llegar a la estructura del compuesto **2**. A través de la comparación con los datos reportados en literatura, **2** corresponde al alcaloide ocoteína, el cual posee un centro asimétrico en la posición 6a cuya configuración fue inferida por el signo de la rotación específica, igual al de otros alcaloides aporfínicos previamente aislados, proponiendo así que la configuración relativa del centro 6a es *S* (35-37).

Para cada uno de los demás alcaloides aislados se reunió la misma información previamente descrita, los datos espectroscópicos se presentan en la Tabla 1 y las estructuras en la Figura 2.

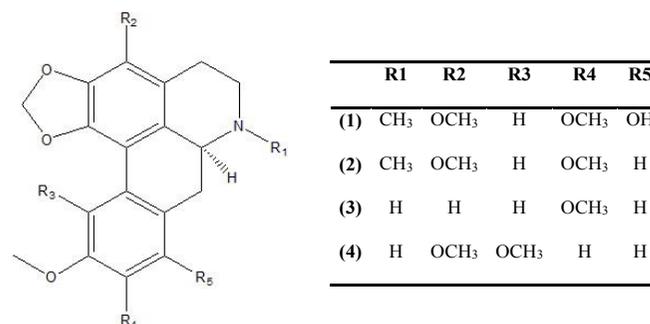


Figura 2. Alcaloides aporfínicos aislados de *Ocotea discolor*

Los compuestos **1** (12 mg) y **2** (7,0 mg) fueron identificados como ocoxilonina y ocoteína, respectivamente, los cuales fueron previamente aislados de las hojas y corteza *Ocotea acutifolia* (19). Los compuestos **3** (30 mg) y **4** (20 mg) fueron identificados como dicentrina, y 1,2-metilendioxi-3, 10, 11-trimetoxiaporfina, aislados de las especies *Cassytha filiformis* (37) y *Cissampelos capensis* (38).

Los resultados del ensayo de actividad anti-TB demuestran que todos los alcaloides aislados de la madera de *Ocotea discolor* inhiben en cierta medida el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. El rango de los valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC) se encuentra entre 140 y 310 µM, siendo la ocoteína (**2**) el alcaloide más activo con un valor de MIC de 50 µg/mL (140 µM), mientras que los otros compuestos muestran menor inhibición (Tabla 2).

Una comparación estructural con algunos alcaloides similares tales como 3-metoxinordomesticina y leucoxina (5, 6), indican que la presencia del benzodioxol es un requisito estructural necesario para la actividad anti-TB. Adicionalmente, la lipofiliidad juega un papel significativo en la actividad, ya que la presencia de grupos hidroxilo cerca al anillo que contiene la sustitución metilendioxi, reduce el efecto anti-TB, como lo demuestra la comparación de la actividad entre la ocoxilonina (**1**) y la ocoteína (**2**).

No hay duda que los alcaloides aporfínicos con sustitución metilendioxi muestran una tendencia de actividad anti-TB, como lo demuestran no solamente los alcaloides de este estudio, sino también 3-metoxinordomesticina, leucoxina, piperolactama A y (-)-nordicentrina (38-40).

## Conclusiones

Los alcaloides ocoxilonina (**1**), ocoteína (**2**), dicentrina (**3**) y 1,2-metilendioxi-3,10,11-trimetoxiaporfina (**4**) se aislaron por técnicas cromatográficas de la madera de *Ocotea discolor*. Los datos espectroscópicos y la comparación con la literatura, permitieron determinar inequívocamente su estructura química. El ensayo de actividad anti-TB confirmó la actividad promisoriosa de los alcaloides aporfínicos que presentan sustitución metilendioxi en alguno de los anillos que conforman el núcleo básico de aporfina. La continuación de los estudios detallados de los alcaloides presentes en las especies neotropicales de la familia Laurácea puede arrojar nuevos esqueletos anti-TB que podrían constituir un punto de partida para el desarrollo de nuevos principios activos contra la tuberculosis.

**Tabla 1.** Datos de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para los cuatro alcaloides aporfínicos aislados de *Ocotea discolor*

no.	1 (CD <sub>3</sub> OD)		2 (CDCl <sub>3</sub> )		3 (CDCl <sub>3</sub> )		4 (CD <sub>3</sub> OD)	
	$\delta_c$	$\delta_H$ (J=Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (J=Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (J=Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (J=Hz)
1	145.7	----	143.6		148.4	----	143.8	----
2	136.4	----	135.1		129.5	----	134.7	----
3	140.9	----	139.3		109.8	6.56 s	140.6	----
3a	119.6	----	117.6		120.8	----	126.0	----
4	24.1	2.70-2.82 m	22.6	2.77-2.91 m	29.6	2.51-2.59 m	24.3	2.85-2.98 m
5	54.2	Ha 3.04-3.18 m	52.9	Ha 3.07-3.20 m	54.5	3.61-3.77 m	48.9	3.20-3.33 m
		Hb 2.42-2.54 m		Hb 2.46-.55 m				
6a	63.5	3.12 t (14.1)	62.1	3.20-3.34 m	63.9	3.02-3.15 m	54.3	2.83-2.95 m
7	26.5	Ha 2.02-2.14 m	33.5	2.74 d (14.0)	34.5	Ha 2.60-2.71 m	34.5	3.60-3.72 m
		Hb 3.59 dd (4.3, 14.1)		3.11 dd (4.3, 14.0)		Hb 3.02-3.18 m		
7a	115.3	----	123.5	----	117.7	----	128.8	----
8	148.2	----	110.0	7.60 s	112.9	6.94 s	113.1	6.88 d (7.9)
9	136.7	----	147.9	-----	148.8	----	112.0	7.4 d (7.9)
10	152.7		147.8	----	149.9	----	150.1	----
11	103.4	7.23 s	111.1	6.77 s	112.0	7.70 s	148.0	----
11a	128.0	----	126.8	----	127.8	-----	127.6	----
11b	112.5	----	111.3	----	105.3	----	111.2	----
11c	127.9	----	126.8	----	124.7	----	123.8	----
N-Me	43.7	2.59 s	43.5	2.61 s	43.9	2.42 s	43.9	2.11 s
1,2 O-CH <sub>2</sub> -O	102.2	Ha 5.93 S	100.6	Ha 5.93 s	102.2	Ha 5.95 s	102.2	Ha 5.95 s
		Hb 6.07 S		Hb 6.08 s		Hb 6.09 s		Hb 6.09 s
3 O-CH <sub>3</sub>	59.9	4.00 S	59.5	4.01 s	----	----	----	----
9 O-CH <sub>3</sub>	61.2	3.80 S	55.9	3.91 s	56.4	3.89 s	56.8	3.88 s
10 O-CH <sub>3</sub>	56.3	3.84 S	56.1	3.90 s	56.6	3.86 s	56.5	3.86 s
11 O-CH <sub>3</sub>	----	----	----	----	----	----	59.9	3.98 s

**Tabla 2.** Actividad antituberculosa *in vitro* de la ocoxilonina (1), ocoteina (2), dicentrina (3) y 1,2-metilendioxi-3,10,11-trimetoxiaporfina (4)

Compuestos	Concentración Mínima Inhibitoria frente a <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv (μM)
1	240
2	260
3	140
4	310
Rifampicina	80 nM

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Colombia por la financiación. También al laboratorio de RMN de la Universidad Javeriana.

## Referencias

- World Health Organization, Genova (WHO), Global tuberculosis report 2016. [Online]. URL: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf> [Consultado el 5 de mayo de 2017].
- Cohen, J. Approval of Novel TB Drug Celebrated--With Restraint. *Science*, **2013**, *339*, 130. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.339.6116.130>.
- Casenghi, M.; Cole, S. T.; Nathan, C. F. New approaches to filling the gap in tuberculosis drug discovery. *PLoS Med.* **2007**, *4*, e293. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.339.6116.130>.
- Copp, B.R.; Pearce, A.N. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 278-297. DOI: <https://doi.org/10.1039/b513520f>.
- Guzman, J. D.; Gupta, A.; Evangelopoulos, D.; Basavannacharya, C.; Pabón, L. C.; Plazas, E. A. *et al.* Anti-tubercular screening of natural products from Colombian plants: 3-methoxynordomesticine, an inhibitor of MurE ligase of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 2101-2107. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkq313>.
- Guzman, J. D.; Pesnot, T.; Barrera, D. A.; Davies, H. M.; McMahan, E.; Evangelopoulos, D. *et al.* Tetrahydroisoquinolines affect the whole-cell phenotype of *Mycobacterium tuberculosis* by inhibiting the ATP-dependent MurE ligase. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 1691-1703. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkv010>.
- Bruni, R.; Medici, A.; Andreotti, E.; Fantin, C.; Muzzoli, M.; Dehesa, M. *et al.* Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chem.* **2004**, *85*, 415-421. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.019>.
- Coutinho, D. F.; Dias, C. S.; Barbosa-Filho, J. M.; Agra, M. F.; Martins, R. M.; Silva, T. M. *et al.* Composition and molluscicidal activity of the essential oil from the stem bark of *Ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez. *J. Essent. Oil Res.* **2007**, *19*, 482-484. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699958>.
- Takaku, S.; Haber, W. A.; Setzer, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, *35*, 525-532. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.02.003>.
- David, J.M.; Yoshida, M.; Gottlieb, O.R. Neolignans from bark and leaves of *Ocotea porosa*. *Phytochemistry.* **1994**, *36*, 491-499. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97102-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97102-4).
- Ishige, M.; Motidome, M.; Yoshida, M.; Gottlieb, O. R. Neolignans from *Ocotea catharinensis*. *Phytochemistry.* **1983**, *22* (2), 4121-4128. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)83046-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)83046-5).
- Lordello, A.L.L.; Yoshida, M. Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis*. *Phytochemistry.* **1997**, *46*, 741-744. DOI: [10.1016/S0031-9422\(97\)00343-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00343-9).
- Sehlapelo, B. M.; Drewes, S. E.; Sandor, P. Ocobullenone: a bicyclo [3.2. 1] octanoid neolignan from *Ocotea bullata*. *Phytochemistry.* **1993**, *32*, 1352-1353. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95121-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95121-5).
- Morais, L.; Pachú, C.; Santos, V.; Barbosa-Filho, T. New lignan from *Ocotea duckei*. *Fitoterapia.* **1996**, *67*, 557.
- Gilbert, B.; Gilbert, M.; De Oliveira, M.; Ribeiro, O.; Wenkert, E.; Wickberg, B. *et al.* The aporphine and isoquinolinedienone alkaloids of *Ocotea glaziovii*. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 694-696. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja01058a031>.
- López, J. A.; Barillas, W.; Gomez-Laurito, J.; Lin, F.-T.; Al-Rehaily, A.J.; Sharaf, M.H. *et al.* Aporphine alkaloids of *Ocotea brenesii*. *Int. J. Pharmacogn.* **1996**, *34*, 145-147.
- Pabon, L. C.; Cuca, L. E. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). *Quím. Nova.* **2010**, *33*, 875-879. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000400021>.
- Custodio, D. L.; da Veiga Junior, V. F. Lauraceae alkaloids. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 21864-21890. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4RA01904K>.
- Garcez, F. R.; Francisca, d. S. A.; Garcez, W. S.; Linck, G.; de Fatima, M. M.; Santos, E.; Queiroz, L. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. *Planta Med.* **2011**, *77*, 383-387. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250401>.
- Andrei, C. C.; Braz-filho, R.; Gottlieb, O. R. Allylphenols from *Ocotea cymbarum*. *Phytochemistry.* **1988**, *27*, 3992-3993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)83069-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)83069-3).
- David, J. M.; Yoshida, M.; Gottlieb, O. R. Phenylpropanoid-catechins from bark of *Ocotea porosa*. *Phytochemistry.* **1994**, *35*, 545-546. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94800-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94800-3).
- de Diaz, A. M.; Gottlieb, H. E.; Gottlieb, O. R. Dehydrodieugenols from *Ocotea cymbarum*. *Phytochemistry.* **1980**, *19*, 681-682. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)87038-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)87038-5).
- Farago, P.V.; Nakashima, T.; Döll, P.M.; Jane, M.B.; Maia, B.H. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from bark of *Ocotea puberula* (Rich.) Ness. *Lat. Am. J. Pharm.* **2010**, *29*, 1242-1245.
- Terreaux, C.; Maillard, M.; Hostettmann, K.; Lodi, G.; Hakizamungu, E. Analysis of the fungicidal constituents from the bark of *Ocotea usambarensis* Engl. (Lauraceae). *Phytochem. Anal.* **1994**, *5*, 233-238. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.2800050503>.
- Yamaguchi, M. U.; Garcia, F. P.; Cortez, D. A. G.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Nakamura, C.V. Antifungal effects of ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Antonie Van Leeuwenhoek.* **2011**, *99*, 507-514. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9516-3>.
- Fournet, A.; Ferreira, M. E.; de Arias, A. R.; Guy, I.; Guinaudeau, H.; Heinzen, H. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia.* **2007**, *78*, 382-384. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.03.003>.
- Marques, R. C. P.; da Silva Dias, C.; Barbosa-Filho, J. M.; Agnez-Lima, L. F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2003**, *536*, 117-120. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00040-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00040-8).

28. Monte Neto, R. L.; Sousa, M.; Dias, C. S.; Barbosa Filho, J. M.; Oliveira, M. R. Yangambin cytotoxicity: a pharmacologically active lignan obtained from *Ocotea duckei vattimo* (Lauraceae). *Z. Naturforschung C*. **2008**, *63*, 681-686. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2008-9-1012>.
29. Zhou, B. N.; Johnson, R. K.; Mattern, M. R.; Wang, X.; Hecht, S. M.; Beck, H. T. *et al.* Isolation and Biochemical Characterization of a New Topoisomerase I Inhibitor from *Ocotea leucoxydon*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 217-221. DOI: <https://doi.org/10.1021/np990442s>.
30. García, A.; Bocanegra-García, V.; Palma-Nicolás, J. P.; Rivera, G. Recent advances in antitubercular natural products. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *49*, 1-23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.12.029>.
31. Tropicos. URL: <http://www.tropicos.org>. (Consultado el 12 de Diciembre del 2015).
32. Merck. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel, 1972. E. Merk; p. 154.
33. Zanin, S. Alcalóides aporfínicos em mudas de *Ocotea puberula* (Reich.) Nees (LAURACEAE). Doutor em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, 2006.
34. Balci, M. Basic <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C- NMR Spectroscopy: 1. Elsevier: Ankara, 2005; p. 117.
35. Velcheva, M. P.; Petrova, R. R.; Samdanghiin, Z.; Danghaaghiin, S.; Yansanghiin, Z.; Budzikiewicz, H. *et al.* Isoquinoline alkaloid N-oxides from *Thalictrum simplex*. *Phytochemistry*. **1996**, *42*, 535-537. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00959-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00959-0).
36. Garcez, F. R.; Francisca, d. S. A.; Garcez, W. S.; Linck, G.; de Fatima, M. M.; Santos, E. *et al.* Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. *Planta Med.* 2011, *77*, 383-387. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250401>.
37. De Wet, H.; Van Heerden, F. R.; Van Wyk, B. E. Alkaloidal variation in *Cissampelos capensis* (Menispermaceae). *Molecules*. **2011**, *16*, 3001-3009. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules16043001>.
38. Tsai, T. H.; Wang, G. J.; Lin, L. C. Vasorelaxing alkaloids and flavonoids from *Cassytha filiformis*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 289-291. DOI: <https://doi.org/10.1021/np070564h>.
39. Mata, R.; Morales, I.; Perez, O.; Rivero-Cruz, I.; Acevedo, L.; Enriquez-Mendoza, I. *et al.* Antimycobacterial Compounds from *Piper santum*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1961-1968. DOI: <https://doi.org/10.1021/np0401260>.
40. Lekphrom, R.; Kanokmedhakul, S.; Kanokmedhakul, K. Bioactive Styryllactones and alkaloid from flowers of *Goniothalamus laoticus*. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *125*, 47-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.06.023>.

**Article citation:**

Albarracín, L. T.; Patiño, O. J.; Guzman, J. D.; Begum, N.; McHugh, T. D.; Cuca, L. E.; Ávila, M. C. Alcaloides aporfínicos con actividad antituberculosa aislados de *Ocotea discolor* Kunth (Lauraceae). *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, *46* (3), 22-27. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n3.62963>.

L. Esmeralda Román<sup>1</sup>, Flavia Castro<sup>2</sup>, Dora Maúrtua<sup>2</sup>, Cesar Condori<sup>1</sup>, Darwin Vivas<sup>1</sup>, Ana E. Bianchi<sup>3,4</sup>, Francisco Paraguay-Delgado<sup>5</sup>, José L. Solís<sup>6</sup>, Mónica M. Gómez<sup>6,\*</sup>



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA

<sup>1</sup>Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, Lima 25, Perú.

<sup>3</sup>LANADI/IFLP (CCT - La Plata) - Dpto. de Física-Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), 115 y 49, 1900 La Plata, Argentina.

<sup>4</sup>Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ingeniería, UNLP, 115 y 49, 1900 La Plata, Argentina.

<sup>5</sup>Centro de Investigación en Materiales Avanzados S. C., CIMAV, Miguel de Cervantes 120, Chihuahua, Chih. México. CP 31109.

<sup>6</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú.

\*Autor para correspondencia: mgomez@uni.edu.pe

Recibido: 2 de Febrero de 2017. Aceptado: 26 de Abril de 2017.

## Nanopartículas de CuO y su propiedad antimicrobiana en cepas intrahospitalarias

### Resumen

Empleando un prototipo de reactor, se sintetizaron nanopartículas (NPs) de CuO a través del método de precipitación a partir de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Las NPs obtenidas fueron caracterizadas mediante XRD, FT-IR, TEM y SEM. La actividad antimicrobiana de las NPs se determinó mediante el método de difusión en placa, colocando 20 mg de NPs de CuO sobre cuatro cepas intrahospitalarias o nosocomiales aisladas de la Unidad de Cuidados Intensivos de un hospital nacional de Lima norte (*Staphylococcus epidermidis*, *Aerococcus viridans*, *Ochrobactrum anthropi* y *Micrococcus lylae*). La caracterización de las NPs de CuO demostró que las sintetizadas a partir de acetato (CuO-Acet) presentaron una fase pura de CuO, mientras que las sintetizadas a partir de sulfato (CuO-Sulf) presentaron dos fases, donde la de CuO representó más del 84%. Los dominios cristalinos del CuO-Acet y CuO-Sulf fueron 15 y 19 nm, respectivamente. Los halos de inhibición de las cepas estudiadas fueron mayores para las NPs de CuO-Sulf que para las NPs de CuO-Acet; solo para la cepa *Ochrobactrum anthropi* se presentaron halos similares para ambos tipos de NPs.

**Palabras clave:** Actividad antimicrobiana, método de difusión en placa, cepas nosocomiales, nanopartículas de CuO.

## CuO nanoparticles and their antimicrobial activity against nosocomial strains

### Abstract

Using a prototype reactor, CuO nanoparticles (NPs) were synthesized through the precipitation method, starting from  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . The obtained NPs were characterized by XRD, FT-IR, SEM, and TEM. The antimicrobial activity of the NPs was determined by the plate diffusion method, placing 20 mg of NPs onto four nosocomial strains obtained from north Lima national hospital Intensive-Care Unit (*Staphylococcus epidermidis*, *Aerococcus viridans*, *Ochrobactrum anthropi*, and *Micrococcus lylae*). NPs characterization revealed that those synthesized from acetate (CuO-Acet) shown pure CuO phase, while those synthesized from sulphate CuO-Sulf shown two phases where CuO was the predominant one, having more than 84%. The crystal domains for CuO-Acet and CuO-Sulf were 15 and 19 nm, respectively. The inhibition halos for the studied strains were larger for CuO-Sulf NPs than CuO-Acet NPs, only *Ochrobactrum anthropi* displayed similar inhibition halos for both types of NPs.

**Keywords:** Antimicrobial activity, plate diffusion method, nosocomial strains, CuO nanoparticles.

## Nanopartículas de CuO e sua propriedade antimicrobiana frente a cepas intrahospitalares

### Resumo

Usando um protótipo de reator, sintetizaram-se nanopartículas (NPs) de CuO pelo método de precipitação a partir de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . As NPs obtidas foram caracterizadas por meio das seguintes técnicas: XRD, FT-IR, TEM e SEM. A atividade antimicrobiana das NPs foi determinada pelo método de difusão em placa, colocando 20 mg de NPs de CuO sobre quatro cepas nosocomiais isoladas de uma Unidade de Terapia Intensiva no hospital nacional de Lima norte (*Staphylococcus epidermidis*, *Aerococcus viridans*, *Ochrobactrum anthropi* e *Micrococcus lylae*). A caracterização das NPs de CuO mostrou que as nanopartículas sintetizadas a partir do acetato (CuO-Acet) apresentavam uma fase pura de CuO, enquanto que as sintetizadas a partir do sulfato (CuO-Sulf), apresentaram duas fases sendo a fase maior de CuO, com mais de 84%. Os domínios cristalinos de CuO-Acet y CuO-Sulf foram 15 e 19 nm, respectivamente. Os halos de inibição das cepas estudadas foram maiores para as NPs de CuO-Sulf do que as NPs de CuO-Acet somente para a cepa *Ochrobactrum anthropi*, apresentaram-se halos de inibição parecidos.

**Palavras-Chave:** Atividade antimicrobiana, método de difusão em placa, cepas nosocomiais, nanopartículas de CuO.

## Introducción

En la actualidad, se han estudiado las NPs de CuO debido a sus promisorias propiedades antimicrobianas (1, 2). Así lo demuestra su efectividad frente a bacterias como *Escherichia coli* (3-5), *Pseudomona aeruginosa* (6), *Klebsiella pneumoniae* (5), *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* (7), *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus*. Además, se ha evidenciado que las NPs de CuO, frente a bacterias como *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, muestran una mayor actividad inhibitoria comparada con el halo de inhibición presentado por los hongos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans* (9). Otras investigaciones corroboran el efecto inhibitorio de las NPs de CuO frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, donde el tamaño de las nanopartículas esta correlacionado con su actividad antimicrobiana (10).

El CuO es usado en la industria cosmética y en prendas textiles por sus propiedades antimicrobianas. Las fibras impregnadas con NPs de CuO presentan un amplio espectro antimicrobiano y antifúngico (11, 12), por tanto, su uso está siendo desarrollado en diferentes partes del mundo en el ámbito de la salud pública (10, 13).

Investigaciones realizadas sobre telas recubiertas con NPs de CuO mostraron una efectiva actividad antimicrobiana frente a los microorganismos *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. aureus* Meticilina Resistente (MRSA, por sus siglas en inglés), reduciendo significativamente la presencia de estos microorganismos (11, 14). También, se han demostrado las propiedades de las NPs de CuO como agente bactericida frente a bacterias estándares (8, 15-17), usándose como soporte en materiales inertes, sin embargo, no existen referencias de su actividad bactericida frente a las bacterias intrahospitalarias.

Ahora bien, la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) reportó que las infecciones nosocomiales o intrahospitalarias (IIH) actualmente llamadas Infecciones Asociadas a la Atención de Salud (IAAS) (18), son una importante causa de morbilidad y mortalidad, lo que demuestra una calidad deficiente en la atención del sector salud (19).

A finales de 1998, el Ministerio de Salud del Perú promovió la vigilancia, prevención y control de las IAAS con la finalidad de mejorar la calidad de atención y, por consiguiente, disminuir la morbilidad, mortalidad y costos hospitalarios (18). Según estudios de la Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud del Perú, se reportaron tasas de prevalencia de IAAS de 4,8% para el 2014 y 3,9% para el 2015 (20). Por tanto, la toma de medidas de bioseguridad en un medio donde se cuenta con pocos recursos económicos y con alta presencia de las IAAS tiene vigencia e importancia en la actualidad (20), teniendo en cuenta que el gasto por paciente que reingresa al hospital es de alrededor de 150000 nuevos soles (21) (aproximadamente 45000 USD), cantidad que podría ahorrarse si se evitan los reingresos y por ende las complicaciones de los pacientes.

Por otro lado, actualmente el Perú es el segundo productor de cobre a nivel mundial y, en el mercado nacional, es viable acceder a sales de cobre de grado técnico para uso industrial a muy bajos costos. El tratamiento de estas sales, para darles un valor agregado, es un aspecto de desarrollo tecnológico importante a nivel nacional.

Por tanto, en el presente trabajo se estudió la síntesis de CuO, utilizando un prototipo de reactor diseñado para producir hasta 100 g de NPs. Adicionalmente, se evaluó la impregnación de estas NPs en textiles de algodón, como respuesta a la problemática nacional de salud relacionada a las IAAS.

## Materiales y métodos

### Síntesis de las nanopartículas de CuO

La síntesis se realizó mediante el método de precipitación (16): se preparon soluciones acuosas de 0,02 M a partir de sales precursoras de acetato de cobre monohidratado ( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) de grado químicamente puro, Merck Millipore, Alemania y sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) de grado técnico suministrado por la empresa J.A. Elmer, Perú. Luego cada solución de sal precursora preparada se vertió en un reactor piloto de acero inoxidable (33" de altura, 15" de diámetro, motor de 1720 revoluciones por minuto (rpm) y 0,37 kW de potencia, calentador por inmersión Rotkappe® de marca MAZURCZAK) tal como se muestra en la Figura 1. La reacción se inició en 100 °C con agitación vigorosa de 500 rpm, luego se agregó una solución de 0,1 M de hidróxido de sodio (NaOH) con 99,0% de pureza de la marca Merck Millipore, Alemania. Inmediatamente, se observó la formación de un precipitado marrón y para completar la reacción se mantuvo el sistema en agitación por 5 min. Posteriormente, el reactor fue vaciado y las NPs de CuO fueron lavadas 3 veces con agua destilada y secadas a 80 °C. Las NPs de CuO obtenidas a partir de las sales precursoras de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  fueron denominadas de CuO-Acet y CuO-Sulf, respectivamente.

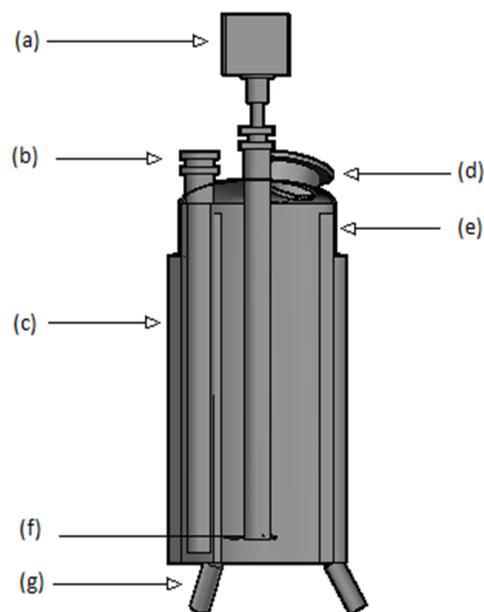


Figura 1. Esquema del reactor usado para la síntesis de las nanopartículas de CuO. (a) motor, (b) calentador, (c) aislamiento térmico, (d) ingreso de reactivos, (e) deflector, (f) agitador, (g) pilares

## Difracción de rayos X

El estudio estructural de las NPS de CuO se realizó por difracción de rayos X empleando un difractómetro PANalytical X'Pert Pro con una radiación CuK  $\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ), equipado con un contador de centelleo y un monocromador de grafito a la salida del haz difractado. Los datos se recolectaron en un rango de  $20^\circ \leq 2\theta \leq 120^\circ$  con  $0,02^\circ$  de ancho de paso y una tasa de conteo no menor de 15 s por paso. El ajuste del difractograma se realizó por el método de Rietveld, utilizando el programa FullProf (22).

## Microscopía electrónica

La caracterización morfológica de las NPS de CuO se realizó por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FEGSEM por sus siglas en inglés), utilizando el microscopio electrónico Zeiss LEO 982 GEMINI, operado a 3 kV. Del mismo modo, se utilizó microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM/TEM) empleando un microscopio electrónico de emisión de campo de alta resolución JEOL JEM-2200FS operado a 200 kV con corrector de aberración esférica en modo STEM.

## Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

Otra caracterización de vibración molecular de las NPs de CuO se llevó a cabo por espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), empleando un espectrofotómetro IR Prestige-21 Shimadzu utilizando la técnica de reflectancia atenuada total (ATR) con rango de análisis de  $4000 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$ .

## Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó el muestreo de 432 superficies correspondientes a tres áreas de UCI: Emergencia (12 muestras), Quirúrgico (12 muestras) y Neonatología (12 muestras). En cada unidad se realizó el hisopado de tres superficies diferentes tomando cuatro ejemplares de cada una de ellas (manijas, barandas, incubadoras e historias clínicas). Las muestras obtenidas fueron sembradas en medios de cultivo Agar Tripticasa de Soya (TSA) y Agar MacConkey e incubadas a  $37^\circ \text{C}$  por 24 h. Finalmente, se realizó el recuento bacteriano en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y cada una de las colonias diferentes fue repicada (acción de trasplantar de un medio de cultivo a otro) en TSA para su posterior identificación.

La identificación de los microorganismos se realizó por pruebas bioquímicas convencionales. Para la identificación de las bacterias Gram positivas se realizó la búsqueda de las enzimas oxidasa, catalasa, coagulasa y DNasa, tipos de hemolisis, fermentación del manitol, susceptibilidad a la bacitracina (0,04 UI – Unidad Internacional) y optoquina (clorhidrato de etilhidrocupreína)  $5 \mu\text{g}$ , logrando determinar el género bacteriano.

En el caso de las bacterias Gram negativas se realizaron pruebas para determinar el tipo de fermentación a los carbohidratos como glucosa, lactosa y sacarosa a través del medio bioquímico Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), presencia de la enzima lisina descarboxilasa (LIA), presencia de motilidad y producción de indol (medio SIM), utilización de citrato como única fuente de carbono y presencia de acetil-metil-carbinol (acetoína) e hidrólisis de la urea (23).

Finalmente se aplicó el sistema de identificación multipruebas Analytical Profile Index (API) de la empresa Biomérieux: API Staph, API Strep para identificar bacterias Gram positivos, API 20E para la Familia Enterobacteriaceae y API NE para las bacterias no fermentadoras (24).

Para determinar la actividad antimicrobiana de las NPs de CuO se utilizó el método de difusión en placa empleado en el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés,) (25). Este método es una modificación del método cilindro placa de cultivo de la Farmacopea Americana USP 32 (26), donde la inhibición bacteriana, mediante la difusión del principio activo de la muestra a probar en un medio de cultivo sólido, es evidenciada con la formación de halos de inhibición (25, 27). Se utiliza, además, un cilindro de acero de 6 mm de diámetro que se ubica al centro de la placa, y dentro del cual se vierte un peso determinado de las nanopartículas (para este trabajo fue 20 mg), permitiendo que estas se distribuyan únicamente en el diámetro del cilindro (28).

Para cada una de las cepas intrahospitalarias aisladas e identificadas (*Staphylococcus epidermidis*, *Aerococcus viridans*, *Ochrobactrum anthropi* y *Micrococcus lylae*), se preparó un inóculo con una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de Mac Farland (29) ( $1,5 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$ ) y se sembró por duplicado sobre la superficie del medio de cultivo TSA, con ayuda de un hisopo estéril. Posteriormente, en el centro de la placa con TSA se colocó el cilindro de acero para inmediatamente añadir  $0,02 \text{ g}$  de NPs de CuO. Al finalizar, las placas se dejaron incubar a  $37^\circ \text{C}$  por 24 h.

Aquellas cepas que presentaron halos de inhibición fueron medidas en mm con ayuda de un Vernier de marca Stanley Hardened. Se realizó el mismo procedimiento con los controles: como control positivo se tenían discos impregnados con  $100 \mu\text{L}$  de desinfectante a base de amonio cuaternario (dilución 1/30), utilizado actualmente en el sector salud; como control negativo, se emplearon discos impregnados con  $100 \mu\text{L}$  de agua destilada estéril. Todas las siembras fueron realizadas por duplicado para cada uno de los controles.

## Resultados y discusión

### Difracción de rayos X

La Figura 2 muestra los patrones de difracción de rayos X de las NPs CuO-Acet y CuO-Sulf. CuO-Acet solamente muestra los picos de difracción correspondiente al CuO, mientras que CuO-Sulf, muestra una segunda fase, identificada como  $\text{Cu}_4\text{SO}_4(\text{HO})_6$  (16%). La fase de CuO en ambas muestras presentó una ligera orientación preferencial del plano (001), cuya intensidad es mayor que la que corresponde a una muestra de CuO sin orientación preferencial.

Los parámetros de red a, b, c y  $\beta$  de la celda monoclinica del CuO fueron determinados por el refinamiento Rietveld de los datos, usando el modelo y estructura inicial según Åsbrink y Norrby (30). Se tuvo en cuenta la contribución de los efectos del tamaño y la tensión interna al ensanchamiento del pico de difracción; ambos parámetros fueron refinados empleando un modelo isotrópico. Los parámetros estructurales y microestructurales obtenidos del refinamiento Rietveld son mostrados en la Tabla 1.

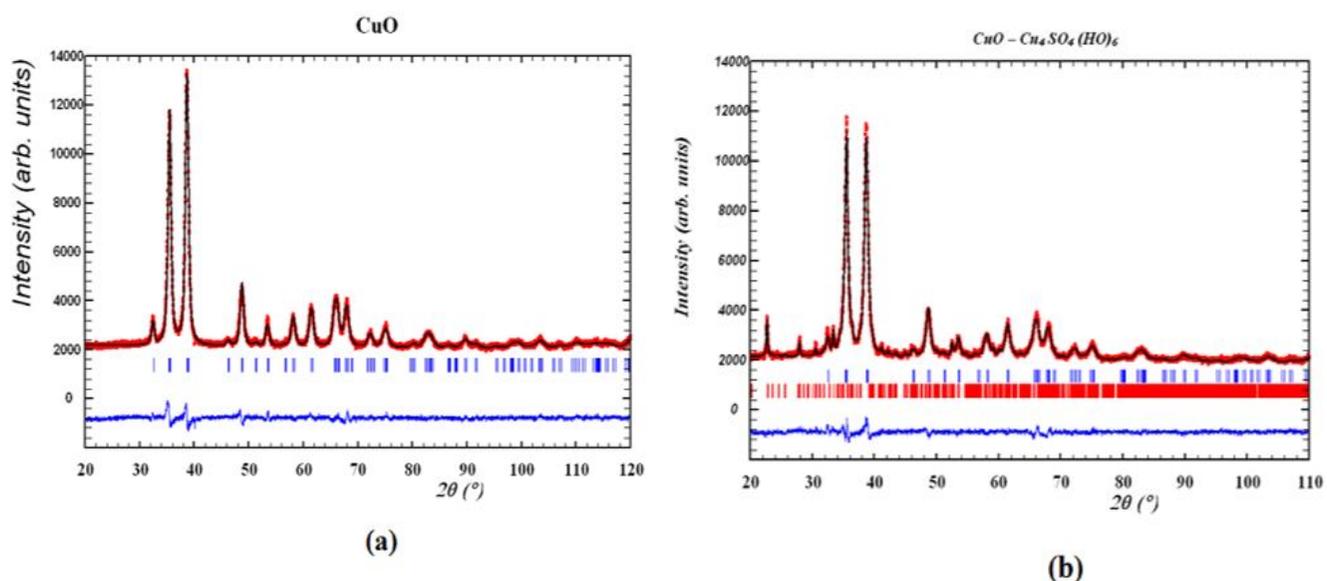


Figura 2. Difractogramas de rayos X de nanopartículas de CuO obtenidas de (a)  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , (b)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Tabla 1. Valores de los parámetros de red, tamaño de cristalito promedio,  $D$ , y microtensión promedio,  $\epsilon$ , para las muestra de NPs obtenidas (solo de la fase de CuO)

	$a$ (Å)	$b$ (Å)	$c$ (Å)	$\beta$ (°)	$D$ nm	$\epsilon$ *
CuO-Acet	4,6902 (1)	3,4282(1)	5,1384(1)	99,34 (1)	15,76 (1)	50,53(4)
CuO-Sulf	4,6944 (1)	3,4247(1)	5,1431(1)	99,40 (1)	19,20 (1)	64,41(4)

Estos picos, indexados respecto al sistema cristalino monoclinico (grupo espacial  $C2/c$ ), archivo N° 45 – 0937 de la base de datos del International Centre for Diffraction Data (ICDD), son característicos de las NPs de CuO (8). La medida del tamaño del cristalito fue estimado del refinamiento de Rietveld y la fórmula de Scherrer, con valores de 15 y 19 nm para las NPs de CuO-Acet y CuO-Sulf, respectivamente.

### Microscopia electrónica

En la Figura 3 se muestra la caracterización morfológica por SEM de las NPs sintetizadas a partir de dos tipos de sales precursoras. En las Figuras 3a y 3b se muestran imágenes a baja (200 kX) y alta (400 kX) magnificación, obtenidas con electrones secundarios de las NPs de CuO-Acet, donde se observan conglomerados de partículas cristalinas de apariencia redondeada con tamaños relativamente heterogéneos que varían entre 20 y 100 nm. Las micrografías de las Figuras 3c y 3d muestran la morfología de las NPs de CuO-Sulf. Estos cristales forman conglomerados laminares, cada uno de ellos tiene partículas alargadas de varios tamaños que van entre 10 y 110 nm.

Las imágenes de la Figura 3 muestran dos morfologías que diferencian las NPs de CuO-Acet y CuO-Sulf. Con la primera sal precursora los aglomerados de CuO son más redondeados que con las obtenidas por la segunda, y presentan aglomerados laminares de CuO alargados (forma de varillas).

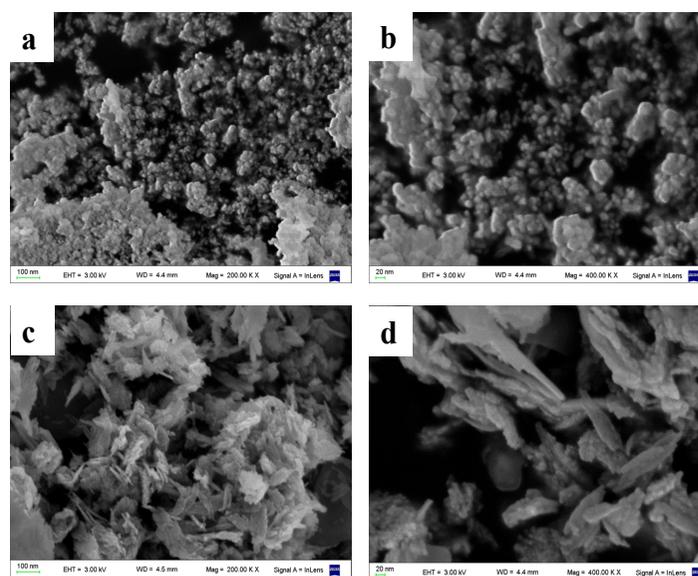
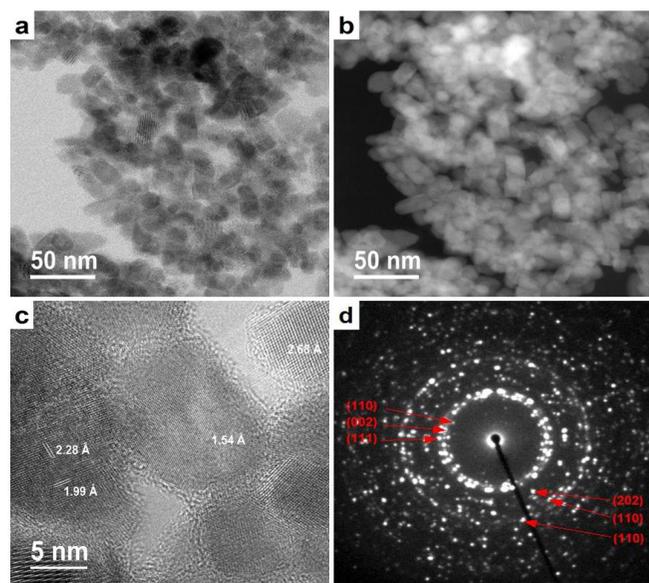


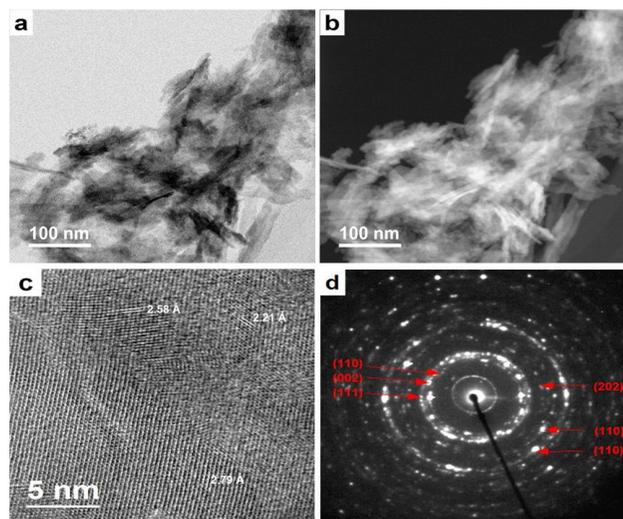
Figura 3. Micrografías electrónicas de emisión de campo de las nanopartículas de CuO a magnificaciones de (a, c) 200,000x y (b, d) 400,000x para muestras obtenidas a partir de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente

Para determinar con mayor detalle las formas y la cristalinidad de las partículas que conforman los conglomerados, se estudiaron las muestras mediante STEM. Las imágenes se adquirieron en modo de campo claro y contraste Z. La Figura 4 muestra las NPs de CuO-Acet, las imágenes en campo claro (Figura 4a) y contraste Z (Figura 4b) muestran la forma de las partículas que conforman los aglomerados de tamaño uniforme, en forma prismática, cuyo ancho es  $\sim 15$  nm y largo de  $\sim 20$  nm.



**Figura 4.** Micrografías electrónicas de las nanopartículas de CuO obtenidas de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ : (a) campo brillante, (b) campo oscuro (c) espacio d, (d) patrón de difracción de nano haz

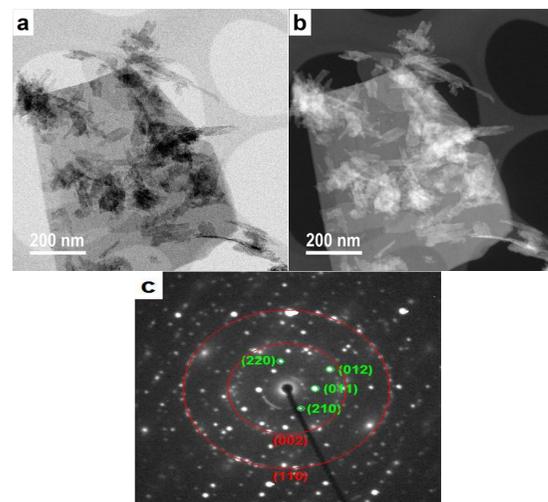
La imagen de la Figura 4c muestra a mayor magnificación la cristalinidad de las partículas. En esta imagen se ven distancias interplanares que corresponden al CuO, cuyos valores están marcados en la imagen. El patrón de difracción de electrones (Figura 4d) corrobora la cristalinidad de las partículas, cuyas intensidades indexan con CuO. Se indican los índices de Miller en la imagen. Esta información es concordante con lo encontrado por XRD.



**Figura 5.** Micrografías electrónicas de las nanopartículas de CuO obtenidas de  $\text{CuSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ : (a) campo brillante, (b) campo oscuro, (c) espacio d, (d) patrón de difracción de nano haz

La Figura 5 muestra en detalle la morfología y la cristalinidad de las NPs de CuO-Sulf; también la imagen en campo claro (Figura 5a) y contraste Z (Figura 5b) muestran el crecimiento alargado de las partículas de CuO-Sulf, con diámetro de  $\sim 10$  nm y longitud de  $\sim 80$  nm. Del mismo modo, la Figura 5c muestra las distancias interplanares de las partículas, cuyos planos cristalinos pertenecen al CuO. El patrón de difracción de electrones muestra intensidades semi-continuas a lo largo del círculo que muestran un crecimiento textural de las NPs, debido a la monocristalinidad de cada una de las partículas alargadas.

Además de estas partículas, la Figura 6 muestra la imagen de una partícula laminar que no fue encontrada en las imágenes por SEM. La imagen de campo claro (Figura 6a) y campo oscuro (Figura 6b) muestran que se encuentra con las partículas alargadas; la intensidad uniforme en la partícula laminar muestra que tiene un espesor uniforme. En el patrón de difracción de electrones (Figura 6c) se observan intensidades puntuales bien marcadas, las cuales corresponden a la fase de  $\text{CuSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , cuyos índices de Miller están en color verde; las otras intensidades provienen de las partículas alargadas.



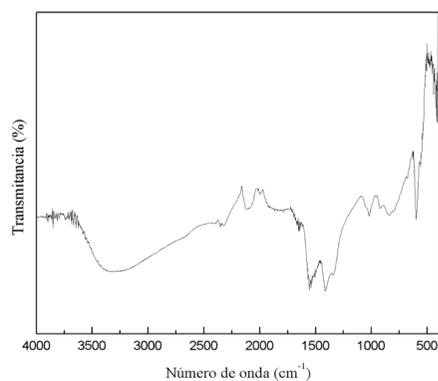
**Figura 6.** Micrografías electrónicas de las partículas  $\text{CuSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  presentes junto con las nanopartículas de CuO: (a) campo brillante, (b) campo oscuro, (c) patrón de difracción de nano haz

A partir de estas imágenes por microscopía electrónica de transmisión, puede observarse que la síntesis de NPs prismáticas se forma con el precursor acetato y, en el caso de las partículas alargadas y laminares monocristalinas, con el precursor sulfato. Usando diferentes tipos de precursores fue posible obtener partículas con morfologías diferentes.

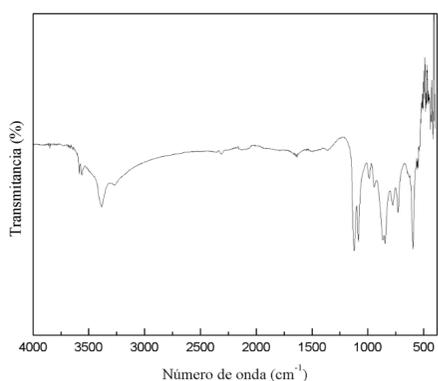
### Spectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

En la Figura 7 se observa el espectro de transmisión de las NPs (a) CuO-Acet y (b) CuO-Sulf. Tanto para las Figuras 7a y 7b las bandas formadas entre  $2500$  a  $4000$   $\text{cm}^{-1}$  son principalmente atribuidas al modo stretching del enlace O-H en la superficie de las NPs de CuO. Además de ello, para ambos espectros la banda formada alrededor de  $1640$   $\text{cm}^{-1}$  es correspondiente al modo bending del agua (12, 31).

En la Figura 7a las bandas en  $1550\text{ cm}^{-1}$  y  $1410\text{ cm}^{-1}$  se pueden atribuir al modo stretching del  $-\text{COO}$  y modo bending del  $-\text{CH}_3$  respectivamente (12, 31). Las bandas entre  $800$  a  $1250\text{ cm}^{-1}$ , específicamente en  $1122\text{ cm}^{-1}$  y  $1085\text{ cm}^{-1}$  de la Figura 7b pueden ser correspondientes a los modos de vibración del  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  remanente sin reaccionar (32). Las bandas de absorción infrarroja en valores menores que  $700\text{ cm}^{-1}$  muestran los modos de vibración característicos de las NPs de CuO. Las bandas en  $473\text{ cm}^{-1}$  y  $597\text{ cm}^{-1}$  de la Figura 7a y las bandas en  $477\text{ cm}^{-1}$  y  $592\text{ cm}^{-1}$  de la Figura 7b corresponden al modo de vibración stretching del enlace Cu-O (12, 33).



(a)



(b)

**Figura 7.** Espectros infrarrojo con transformada de Fourier de nanopartículas de CuO: (a)  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , (b)  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

### Actividad antimicrobiana

De la evaluación de la actividad antimicrobiana, se observó que los halos de inhibición para el control positivo para *Staphylococcus epidermidis*, *Aerococcus viridans*, *Ochrobactrum anthropi* y *Micrococcus lylae* fueron de 21, 18, 7 y 19 mm, respectivamente, mientras que para el control negativo fue de 6 mm para todas las bacterias estudiadas. En la Figura 8 se muestra la formación de halos de inhibición para las nanopartículas de CuO-Acet para bacterias: (a) *Staphylococcus epidermidis* (12 mm), (b) *Aerococcus viridans* (10 mm), (c) *Ochrobactrum anthropi* (16 mm) y (d) *Micrococcus lylae* (14 mm). Las nanopartículas de CuO-Sulf presentaron los siguientes halos de inhibición: (e) *Staphylococcus epidermidis* (17 mm), (f) *Aerococcus viridans* (13 mm), (g) *Ochrobactrum anthropi* (16 mm) y (h) *Micrococcus lylae* (16 mm); la Tabla 2 muestra un resumen de estos datos.

También se visualiza claramente la presencia de un color azulado oscuro alrededor de las NPs, lo que indica un proceso de formación de complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  en el medio agar. Los iones del  $\text{Cu}^{2+}$  para el caso de las NPs CuO-Acet, probablemente corresponden a un proceso de disolución de los átomos externos de las NPs. Para el caso de las NPs CuO-Sulf, se puede esperar que los  $\text{Cu}^{2+}$  provengan también de la fase  $\text{Cu}_4\text{SO}_4(\text{HO})_6$ .

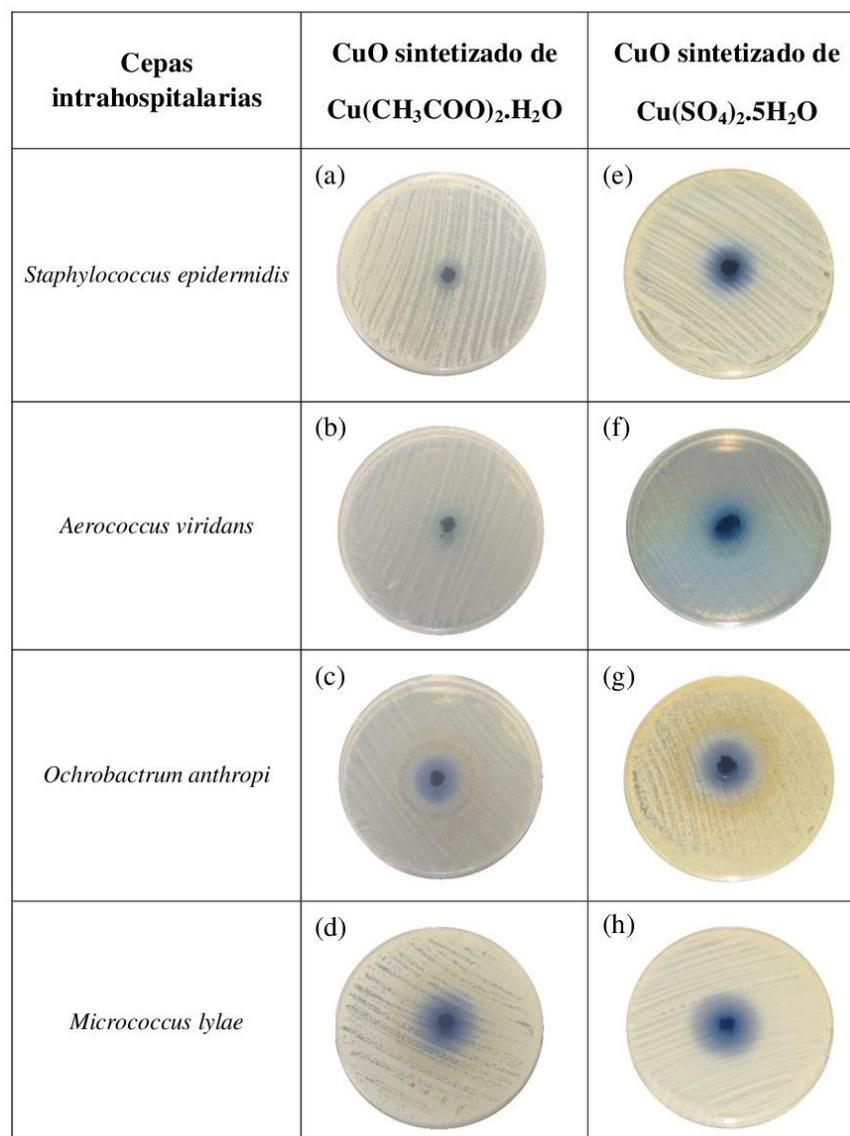
**Tabla 2.** Valores de los diámetros de los halos de inhibición (mm) para las diferentes cepas intrahospitalarias enfrentadas a las NPs de CuO obtenido de diferentes reactivos. Se presentan también los valores para los controles positivo (desinfectante a base de amonio cuaternario diluido en 1/30) y negativo (agua destilada)

Cepa intrahospitalaria	CuO-Acet (mm)	CuO-Sulf (mm)	Control positivo (mm)	Control negativo (mm)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12	17	21	6
<i>Aerococcus viridans</i>	10	13	18	6
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	16	16	7	6
<i>Micrococcus lylae</i>	14	16	19	6

Una posible explicación a la inhibición bacteriana por parte de las nanopartículas de CuO podría ser la interacción directa que se estaría dando con la superficie de la membrana externa de la bacteria. En este contexto, estudios realizados con óxidos metálicos sugieren que la actividad antimicrobiana estaría dándose por las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) producidas por la presencia de estos óxidos. Allí, las especies de oxígeno estarían interactuando con la membrana celular de la bacteria y permitiendo el ingreso de las nanopartículas a la célula (34). Otros estudios realizados observan que el efecto antimicrobiano de estas nanopartículas aumenta con la concentración utilizada, por lo que probablemente esta inhibición se deba al aumento de interrupciones generadas por las nanopartículas de CuO en la superficie de la membrana de la célula generando así un mal funcionamiento de los componentes de la célula tales como el ADN, lípidos, peptidoglicanos y proteínas (34, 35).

Muchos investigadores afirman que el mecanismo esencial para la citotoxicidad que generan las nanopartículas es la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  que reaccionan con los grupos tiol (SH) de las proteínas presentes en la superficie de la membrana de la célula bacteriana. Estas proteínas sobresalen de la membrana celular, permitiendo el transporte de nutrientes a través de la pared celular. Las nanopartículas estarían inactivando estas proteínas, reduciendo la permeabilidad de la membrana y llevando a la célula a la muerte (36, 37).

En este trabajo, la liberación de los iones  $\text{Cu}^{2+}$  podría proceder más fácilmente de las NPs de CuO-Sulf, dado que en ellas se encuentra también una pequeña cantidad de  $\text{Cu}_4\text{SO}_4(\text{HO})_6$  el cual, por su forma hidratada, interactúa más fácilmente con el medio agar, a diferencia de las NPs de CuO-Acet.



**Figura 8.** Actividad antimicrobiana de nanopartículas de CuO obtenidas de (a-d)  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , (e-h)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Otros trabajos de investigación han demostrado que las células bacterianas, luego de la fijación inicial a una superficie, se mantienen unidas por un polímero extracelular y forman una biopelícula. Entonces, suprimir la formación de la biopelícula es una forma de prevenir o evitar el crecimiento de las bacterias (38). Así, se ha observado que recubrimientos delgados de ZnO que tienen una superficie compuesta de agujas de tamaño nanométrico, pueden penetrar en la membrana celular cuando están en contacto. Además, tales características de la estructura superficial de la película de ZnO afecta la última etapa del desarrollo de la biopelícula. Por lo anterior, el efecto combinado de las características nanoscópicas de la aguja y las propiedades antibacterianas del ZnO son los responsables del menor número de bacterias en una superficie (39, 40). Se puede decir entonces, de manera análoga, que la morfología alargada y laminar de las NPs de CuO-Sulf favorece la interacción de estas con la membrana celular de las bacterias a diferencia de las NPs de CuO-Acet que presentaron forma globular.

## Conclusiones

La caracterización de las NPs de CuO demostró que cuando son sintetizadas a partir de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  presentan una fase de CuO pura, mientras que si se sintetizan a partir de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  presentan dos fases, siendo la fase mayoritaria de CuO. Lo anterior puede deberse a la pureza grado técnico de la sal precursora. Sin embargo, se puede observar que ambos tipos de NPs tienen un efecto antimicrobiano frente a las diferentes cepas intrahospitalarias de un hospital nacional de Lima norte.

Los halos de inhibición de las cepas estudiadas fueron mayores para las NPs de CuO obtenidas a partir de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  que para las obtenidas a partir de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; solo para la cepa *Ochrobactrum anthropi* presentan halos similares. Este hecho se sustentaría, no solo en la pureza del CuO, sino también debido a que la morfología de las NPs de CuO de formas alargadas y laminares, obtenidas a partir de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , podrían dañar con mayor facilidad la membrana celular de las bacterias, lo que conllevaría a la inactivación de las mismas.

## Agradecimientos

M.M.G.L. agradece al Instituto General de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería (IGI-UNI) por financiación otorgada como Docente Investigador. Se agradece al laboratorio nacional de nanotecnología ubicado en CIMAV Chihuahua, México, por el apoyo de microscopia electrónica. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) - Proyecto PIP 00651 - Argentina, a la Universidad Nacional de La Plata - Proyecto 11/X709 y al Sistema Nacional de rayos X (SNRX) y CONICET - Proyectos RX-M6 y RX-AC7, Argentina, por el apoyo en difracción de rayos X. A.E.B., agradece a Graciela Punte, por la supervisión en los diferentes trabajos desarrollados. El presente trabajo fue desarrollado bajo la financiación recibida por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad - Innóvate Perú (Convenio 368-PNIPC-PIAP-2014) y el IGI-UNI.

## Referencias

- Katwal, R.; Kaur, H.; Sharma, G.; Naushad, M.; Pathania, D. Electrochemical synthesized copper oxide nanoparticles for enhanced photocatalytic and antimicrobial activity. *J. Ind. Eng. Chem.* **2015**, *31*, 173-184. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2015.06.021>.
- Raghunath, A.; Perumal, E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: A promise for the future. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2017**. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011>.
- Yoosefi Booshehri, A.; Wang, R.; Xu, R. Simple method of deposition of CuO nanoparticles on a cellulose paper and its antibacterial activity. *Chem. Eng. J.* **2015**, *262*, 999-1008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.09.096>.
- Sharmila, G.; Thirumarimurugan, M.; Sivakumar, V. M. Optical, catalytic and antibacterial properties of phytofabricated CuO nanoparticles using Tecoma castanifolia leaf extract. *Optik.* **2016**, *127*(19), 7822-7828. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijleo.2016.05.142>.
- Christy, A. J.; Nehru, L. C.; Umadevi, M. A novel combustion method to prepare CuO nanorods and its antimicrobial and photocatalytic activities. *Powder Technol.* **2013**, *235*, 783-786. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2012.11.045>.
- Das, D.; Nath, B. C.; Phukon, P.; Dolui, S. K. Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles. *Colloids Surf., B.* **2013**, *101*, 430-433. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.002>.
- Sonia, S.; Jayasudha, R.; Jayram, N. D.; Kumar, P. S.; Mangalaraj, D.; Prabakaran, S. R. Synthesis of hierarchical CuO nanostructures: Biocompatible antibacterial agents for Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Curr. Appl. Phys.* **2016**, *16* (8), 914-921. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cap.2016.05.006>.
- Ahamed, M.; Alhadlaq, H. A.; Khan, M. A. M.; Karupiah, P.; Al-Dhabi, N. A. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles. *J. Nanomater.* **2014**, *2014*, 1-4. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/637858>.
- Ramyadevi, J.; Jeyasubramanian, K.; Marikani, A.; Rajakumar, G.; Rahuman, A. A. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Mater. Lett.* **2012**, *71*, 114-116. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2011.12.055>.
- Azam, A.; Ahmed, A. S.; Oves, M.; Khan, M. S.; Memic, A. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 3527-3535. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S29020>.
- Abramovaa, A.; Gedankenb, A.; Popov, V.; Ooi, E.; Masond, T. J.; Joyce, E. M. A sonochemical technology for coating of textiles with antibacterial nanoparticles and equipment for its implementation. *Mater. Lett.* **2013**, *96*, 121-124. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2013.01.041>.
- Mageshwari, K.; Sathyamoorthy, R. Flower-shaped CuO nanostructures: Synthesis, characterization and antimicrobial activity. *J. Mater. Sci. Technol.* **2013**, *29* (10), 909-914. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmst.2013.04.020>.
- Perelshtein, I.; Lipovsky, A.; Perkas, N.; Tzanov, T.; Arguirova, M.; Leseva, M. *et al.* Making the hospital a safer place by sonochemical coating of all its textiles with antibacterial nanoparticles. *Ultrason. Sonochem.* **2015**, *25*, 82-88. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.12.012>.
- El-Nahhal, I.; Zourab, S.; Kodeh, F.; Selmane, M.; Genois, I.; Babonneau, F. Nanostructured copper oxide-cotton fibers: synthesis, characterization, and applications. *Int. Nano Lett.* **2012**, *2* (14), 1-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/2228-5326-2-14>.
- Nasser Mohammed, H. M. S. Z. Polymethacrylic acid as a new precursor of CuO nanoparticles. *J. Mol. Struct.* **2012**, *1027*, 128-132. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.05.081>.
- Rios Valer, G. B. Estudio morfológico y estructural de nanopartículas de CuO empleando técnicas de dispersión de luz y rayos X. Bach. Tesis, Universidad Nacional de Ingeniería, Perú, 2015.
- Karthik, A. D.; Geetha, K. Synthesis of copper precursor, copper and its oxide nanoparticles by green chemical reduction method and its antimicrobial activity. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2013**, *3* (5), 016-021. DOI: <http://dx.doi.org/10.7324/japs.2013.3504>.
- Garro Nuñez, G. M.; Eufelia Quispe Pardo, Z. E. Protocolo: Estudio de prevalencia de infecciones intrahospitalarias. Ministerio de Salud - Dirección General de Epidemiología, Perú, 2014; pp 15-24.
- World Health Organization World health statistics 2015. WHO, Geneva, 2015; pp 55-77.
- Díaz-Vélez, C.; Neciosup-Puicán, E.; Fernández-Mogollón, J. L.; Tresierra-Ayala, M. A.; Apolaya-Segura, M. Mortalidad atribuible a infecciones nosocomiales en un hospital de la Seguridad Social en Chiclayo, Perú. *Acta Med. Peru.* **2016**, *33* (3), 250-252.
- Jefatura del Servicio de Cuidados Intensivos Generales (SCIG) Proyecto de cuidados intermedios del servicio de cuidados intensivos generales, 2°. Ministerio de Salud - Hospital Cayetano Heredia, Lima, 2016; pp 14-15.
- Rodríguez-Carvajal, J.; Fernández-Díaz, M. T.; Martínez, J. L. Neutron diffraction study on structural and magnetic properties of La<sub>2</sub>NiO<sub>4</sub>. *J. Phys. Condens. Matter.* **1991**, *3* (9), 3215-3234. DOI: <http://dx.doi.org/10.1088/0953-8984/3/19/002>.
- Bou, G.; Fernández-Olmos, A.; García, C.; Saez-Nieto, J. A.; Valdezate, S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2011**, *29*(8), 601-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>.

24. Gobernado, M.; López-Hontangas, J. L. Identificación bacteriana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2003**, *21*(2), 54-60.
25. Taroco, R.; Seija, V.; Vignol, R., Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica, en Temas de Bacteriología y Virología Médica, Oficina del libro FEFMUR, Uruguay, 2006; pp 665-668.
26. The U.S. Pharmacopeial Convention USP Pharmacists pharmacopeia 2008-2009, 2° ed. Amer. Soc. of Health System, Rockville, 2009; pp s3/3-s3/6.
27. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Infect.* **2000**, *6* (9), 509-515. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>.
28. Bonev, B.; Hooper, J.; Parisot, J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61* (6), 1295-301. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn090>.
29. Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfäuer, M. A. Microbiología Médica, 6° ed. Elsevier: España; 2009.
30. Åsbrink, S.; Norrby, L.-J. A refinement of the crystal structure of copper (II) oxide with a discussion of some exceptional e.s.d.'s. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **1970**, *26* (1), 8-15. DOI: <http://dx.doi.org/10.1107/s0567740870001838>.
31. Tackett, J. E. FT-IR characterization of metal acetates in aqueous solution. *Appl. Spectrosc.* **1989**, *43* (3), 483-489. DOI: <http://dx.doi.org/10.1366/0003702894202931>.  
Siriwardane, R. V.; Poston Jr., J. A.; Fisher, E. P.; Shen, M.;
32. Miltz, A. L. Decomposition of the sulfates of copper, iron (II), iron (III), nickel, and zinc: XPS, SEM, DRIFTS, XRD, and TGA study. *Appl. Surf. Sci.* **1999**, *152* (3-4), 219-236. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-4332\(99\)00319-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-4332(99)00319-0).
33. Amin, S. A.; Pazouki, M.; Hosseinnia, A. Synthesis of TiO<sub>2</sub>-Ag nanocomposite with sol-gel method and investigation of its antibacterial activity against *E. coli*. *Powder Technol.* **2009**, *196* (3), 241-245. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2009.07.021>.
34. Dizaj, S. M.; Lotfipour, F.; Barzegar-Jalali, M.; Zarrintan, M. H.; Adibkia, K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater. Sci. Eng., C.* **2014**, *44*, 278-284. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.031>.
35. Azam, A.; Ahmed, A. S.; Oves, M.; Khan, M. S.; Habib, S. S.; Memic, A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 6003-6009. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S35347>.
36. Gopinathan, E.; Viruthagiri, G.; Shanmugam, N.; Sathiyapriya, S. Optical, surface analysis and antibacterial activity of ZnO-CuO doped cerium oxide nanoparticles. *Optik.* **2015**, *126* (24), 5830-5835. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijleo.2015.09.014>.
37. Michal, R.; Dworniczek, E.; Caplovicova, M.; Monfort, O.; Lianos, P.; Caplovic, L. *et al.* Photocatalytic properties and selective antimicrobial activity of TiO<sub>2</sub> (Eu)/CuO nanocomposite. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *371*, 538-546. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.03.003>.
38. Garrett, T. R.; Bhakoo, M.; Zhang, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog. Nat. Sci.* **2008**, *18* (9), 1049-1056. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>.
39. Dai, Y.; Sun, T.; Zhang, Z.; Zhang, Z. J.; Li, J. R. Effect of zinc oxide film morphologies on the formation of *Shewanella putrefaciens* biofilm. *Biointerphases.* **2017**, *12* (1), 011002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1116/1.4976003>.
40. Singh, A. V.; Vyas, V.; Patil, R.; Sharma, V.; Scopelliti, P. E.; Bongiorno, G. *et al.* Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation. *PLoS One.* **2011**, *6* (9), e25029. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025029>.

**Article citation:**

Román, L. E.; Castro, F.; Maúrtua, D.; Condori, C.; Vivas, D.; Bianchi, A. E.; Paraguay-Delgado, F.; Solis, J. L.; Gómez, M. M. Nanopartículas de CuO y su propiedad antimicrobiana en cepas intrahospitalarias. *Rev. Colomb. Quím.* **2017**, *46* (3), 28-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n3.62386>.



Carmen R. Silupú<sup>1</sup>, Rosa L. Solís<sup>2</sup>, Gerardo J. F. Cruz<sup>3\*</sup>, Mónica M. Gómez<sup>4</sup>, José L. Solís<sup>4</sup>, Riitta L. Keiski<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Maestría en Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional de Piura, Campus Universitario s/n Miraflores, Piura, Perú

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Tumbes, Av. Universitaria s/n Pampa Grande, Tumbes, Perú.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Tumbes, Av. Universitaria s/n Pampa Grande, Tumbes, Perú.

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú.

<sup>5</sup>Faculty of Technology, University of Oulu, P.O.Box 4300, FI-90014, Finland.

\*Autor para correspondencia: gcrucz@untumbes.edu.pe

Recibido: 24 de Enero de 2017. Aceptado: 09 de Mayo de 2017.

## Caracterización de filtros comerciales para agua a base de carbón activado para el tratamiento de agua del río Tumbes - Perú

### Resumen

Se caracterizaron y se evaluaron carbones activados comerciales (A, B, C y D) utilizados en filtros para el tratamiento de agua en la descontaminación de metales pesados presentes en agua de río y en la eliminación de microorganismos coliformes; los carbones comerciales resultaron tener estructuras microporosas y mesoporosas. Se determinaron áreas superficiales entre 705 y 906 m<sup>2</sup>/g. Los carbones fueron amorfos y se detectó la presencia de agentes antibacterianos, tales como Ag, Cl, Cu y Si. Se determinó que para el As y Pb, cuyas concentraciones iniciales en el agua contaminada (agua del Río Tumbes-Perú) fueron 56,7 y 224,0 µg/L, respectivamente, el porcentaje de adsorción fue cercano al 100%. También se encontró que la relación entre el pH de carga cero de los carbones y pH del agua del río durante los experimentos juega un rol determinante en la adsorción de los elementos analizados. Por otro lado, la capacidad antibacteriana fue evaluada satisfactoriamente frente a las siguientes cepas de bacterias gram negativas fecales: *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup>), *Salmonella typhimurium* (ATCC<sup>®</sup> 14028<sup>™</sup>) y *Shigella flexneri* (ATCC<sup>®</sup> 12022<sup>™</sup>). Esta capacidad se basa en la presencia superficial en los carbones de los agentes antibacterianos mencionados.

**Keywords:** carbón activado, adsorción de As y Pb, remoción de bacterias fecales.

## Characterization of water commercial filters based on activated carbon for water treatment of the Tumbes river - Peru

### Abstract

Commercial activated carbon samples (A, B, C, and D) used in filters for the treatment of water were characterized and evaluated in the decontamination of heavy metals present in river water and in the elimination of coliform microorganisms. The carbon samples had microporous and mesoporous structures. Surface areas of between 705 and 906 m<sup>2</sup>/g were found. The carbon samples were amorphous and the presence of antibacterial agents such as Ag, Cl, Cu, and Si was detected. It was determined that for As and Pb, whose initial concentrations in contaminated water (water of the Tumbes river-Peru) were 56.7 and 224.0 µg/L, respectively, the percentage of adsorption was close to 100%. The relationship between point of zero charge pH of the activated carbons and pH of the river water during the experiments plays a determinant role in the adsorption of the analyzed elements. The antibacterial capacity was evaluated satisfactorily against the following strains of fecal gram negative bacteria: *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup>), *Salmonella typhimurium* (ATCC<sup>®</sup> 14028<sup>™</sup>), and *Shigella flexneri* (ATCC<sup>®</sup> 12022<sup>™</sup>). This ability is based on the surface presence in the carbons of the mentioned antibacterial agents.

**Palabras clave:** activated carbon, adsorption of As and Pb, removal of fecal bacteria.

## Caracterização de carvão ativado de filtros comerciais para tratamento da água do rio Tumbes - Perú

### Resumo

Carvões ativados comerciais (A, B, C e D) usado em filtros para o tratamento de água foram caracterizados e avaliados na descontaminação de metais pesados da água do rio e para a remoção de microorganismos coliformes. Os carvões comerciais mostraram estruturas microporosas e mesoporosas. Foram determinadas as áreas superficiais entre 705 e 906 m<sup>2</sup>/g. As amostras de carvão foram amorfas e foi detectada a presença de agentes antibacterianos, tais como Ag, Cl, Cu e Si. Determinou-se que, no caso de As e Pb, cujas concentrações iniciais na água contaminada (água do rio Tumbes-Peru) foram de 56,7 e 224,0 µg/L respectivamente, a taxa de adsorção foi de quase 100%. Também foi encontrado que a relação entre o pH de carga zero dos carvões e o pH da água do rio durante as experiências desempenha um papel decisivo na adsorção dos elementos analisados. Além disso, a capacidade antibacteriana foi avaliada com sucesso contra as seguintes variedades de bactérias gram negativas de origem fecal: *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup>), *Salmonella typhimurium* (ATCC<sup>®</sup> 14028<sup>™</sup>) e *Shigella flexneri* (ATCC<sup>®</sup> 12022<sup>™</sup>). Esta capacidade esta baseada na presença de agentes bacterianos na superfície dos carvões.

**Palavras-Chave:** carvão ativado, adsorção de As e Pb, remoção de bactérias fecais.

## Introducción

La contaminación del agua en el Perú se ha convertido en un grave problema que alcanza distintos territorios y genera diferentes dificultades. Una de estas dificultades está relacionada con el deterioro de la calidad del agua del Río Tumbes por el vertimiento de metales pesados y otros elementos, producto de la minería artesanal, y por la carga orgánica y microbiana, producto de la actividad urbana en la parte alta de la cuenca.

El Río Tumbes es un río binacional que nace en Ecuador en cuya parte alta, cerca de las poblaciones de Portobello y Zaruma, se desarrolla ilegalmente minería aurífera artesanal. A su vez, las poblaciones ubicadas en la parte alta de la cuenca vierten sus aguas residuales, tratadas y sin tratar, al cauce del Río Tumbes cargándolo de materia orgánica y bacterias fecales (1).

Durante el año 2014, el Proyecto de Modernización del Recurso Hídrico, manejado por la Autoridad Nacional del Agua (2), estableció que 52% de los parámetros analizados en el Río Tumbes excedieron los estándares de calidad ambiental de agua (3). Dentro de estos parámetros se encontraron niveles altos de los coliformes fecales y cantidades totales de elementos como: P, Al, Sb, As, Cd, Fe, Mn y Pb. Esto afecta a las poblaciones rurales que toman el agua del río de manera directa o con un tratamiento muy precario. A pesar de este problema sanitario, no se han establecido medidas concretas que puedan servir para mitigar los efectos de la contaminación del Río Tumbes.

Los metales pesados y los metaloides son uno de los principales grupos inorgánicos contaminantes del agua y son altamente peligrosos para el ser humano. Este peligro se debe a que pequeñas concentraciones metálicas tienen la capacidad de bioacumularse en el organismo y son causa de varios problemas de salud que pueden derivar incluso en cáncer (4), como ocurre con el As, Cd y Pb, entre los más peligrosos. Al respecto, los estándares de calidad ambiental (5) definen para la categoría A: poblacional y recreacional; subcategoría A1: aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección, que las concentraciones máximas permitidas de As, Cd y Pb son 10, 3 y 10 µg/L, respectivamente.

El agua potable en el Perú ha sido definida en el Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano establecido en la norma vigente (Decreto Legislativo Supremo N° 031-2010-SA) (6), que establece como límites permisibles un máximo de 500 bacterias heterotróficas por mL y ausencia absoluta de coliformes totales y fecales. De los muchos microorganismos infecciosos que se pueden encontrar en el agua destacan bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*. Estos microorganismos pueden provocar síntomas como náuseas, vómitos, diarrea y calambres estomacales. En personas adultas, con un buen estado de salud, pueden ocasionar enfermedades leves y de poca duración, mientras que en bebés, niños, ancianos y personas con el sistema inmunológico deprimido pueden revestir mayor gravedad.

Actualmente existe una serie de filtros comerciales en el mercado que contienen distintos materiales adsorbentes, algunos de ellos con propiedad antibacteriana, los cuales han sido diseñados para el tratamiento final del agua para consumo humano. Estos filtros son usualmente colocados a la salida del grifo de agua potable para dar un tratamiento final al agua de consumo y, aparentemente, aseguran la reducción de compuestos orgánicos e inorgánicos que podría contener el agua, así como la eliminación del 99,9 % de los microorganismos presentes. Por lo anterior, estos filtros han sido considerados como una opción viable para ser usados en las áreas rurales de Tumbes y conseguir agua apta para el consumo humano.

Así, la presente investigación tiene por objetivo caracterizar los materiales que componen los filtros comerciales (A, B, C y D) que reportan usar carbón activado como material adsorbente y evaluar su potencial uso en el tratamiento del agua del Río Tumbes. Son muy escasas las investigaciones realizadas con soluciones multicomponentes como agua real contaminada, evaluando la presencia de otros cationes y aniones en ella. Además, se evaluó la relación entre las propiedades de los carbones, su capacidad de adsorción de metales y su actividad antibacteriana.

## Materiales y métodos

Fueron extraídos de sus respectivos cartuchos cuatro materiales procedentes de filtros comerciales (A, B, C y D), utilizados en el tratamiento final del agua para consumo humano y comercializados en los principales centros comerciales del país. Después fueron molidos y finalmente tamizados a un tamaño de partícula menor de 0,25 mm. A pesar de que sus propiedades puedan variar, debido a que el tamaño de partícula influye en la adsorción, es necesario homogenizar los tamaños de grano de las muestras en estudio para luego poder compararlas.

Estos materiales se caracterizaron desde el punto de vista morfológico, estructural, textural y químico. Las propiedades morfológicas fueron determinadas mediante microscopía electrónica de barrido, utilizando un microscopio electrónico con emisión de campo (FESEM, por sus siglas en inglés) marca Zeiss modelo Ultra Plus (Carl Zeiss AG, Alemania). Este microscopio electrónico tuvo acoplado un espectrómetro de energía dispersa (EDS) INCA® x-act (Oxford Instruments, Reino Unido) que permitió la determinación de algunos de los componentes superficiales de los materiales estudiados. Para obtener las imágenes con el FESEM las muestras fueron recubiertas con platino, mientras que para la obtención de los espectros EDS se utilizó un recubrimiento de carbono con las muestras en su tamaño original.

El estudio estructural de los materiales se realizó empleando un difractor de rayos X marca Siemens (Siemens AG, Alemania) modelo D5000 operado con radiación CuK $\alpha$ .

Para el análisis textural se utilizó la técnica de adsorción-desorción con N $_2$  a 77 K en un analizador de área superficial Gemini VII 2390 (Micromeritics, USA). El área superficial específica ( $S_{BET}$ ) fue determinada con el método desarrollado por Brunauer–Emmett–Teller (BET) de acuerdo a lo recomendado por la IUPAC (7). El valor del volumen total o neto ( $V_{net}$ ) se calculó a partir del valor del volumen (de gas) en la isoterma de adsorción de N $_2$  para la presión relativa más cercana al valor 0,999. Los valores del volumen de microporos ( $V_{micro}$ ) y área superficial mesoporosa ( $S_{meso}$ ) se calcularon mediante el método de *t*-plot usando la ecuación de la norma ASTM standard D-6556-01 (8). La distribución de tamaños de mesoporos se realizó utilizando el modelo de Horvath-Kawazoe, suponiendo una geometría de poros de ranura (*slit pore geometry*) (9).

El punto de carga cero ( $pH_{pzc}$ ) fue determinado mediante el método de *pH drift*, para lo cual se prepararon soluciones 0,01 M de KNO $_3$  burbujeadas con N $_2$  durante 40 min. Se pusieron 50 mL de estas soluciones en diferentes frascos y se modificó el pH para alcanzar valores entre 3 y 10 (8 puntos en total). Estos valores de pH fueron alcanzados mediante la adición de soluciones de 0,1 y 0,01 M de NaOH y H $_2$ SO $_4$ , respectivamente.

Se colocó en cada frasco 0,1 g de las muestras de carbón activado y se mantuvo en agitación por 48 h hasta alcanzar el equilibrio. Luego, las muestras fueron filtradas y el pH final fue medido. El  $pH_{pZC}$  fue calculado de la intersección entre la curva  $pH_{inicial}$  vs  $pH_{final}$  y la curva resultante del supuesto que  $pH_{inicial}$  es igual a  $pH_{final}$  (10).

Para las medidas de cinética de adsorción, la recolección de la muestra de agua se realizó en el Río Tumbes en la zona de Cabo Inga (Frontera Peru-Ecuador), durante la época de estiaje (mes de Diciembre), considerando que en esta época se tiene la concentración máxima de contaminantes en el agua, a diferencia de la época lluviosa donde esta concentración se diluye. Inmediatamente después del muestreo del agua, esta fue acidificada con ácido nítrico hasta llegar a un  $pH < 3$ , con la finalidad de evitar la precipitación de los metales pesados y otros elementos. Antes de los experimentos, el pH del agua se reguló a valores entre 6 y 6,5 para acercarse al valor de pH real del río de 7.

Para las pruebas cinéticas se utilizó un volumen de agua de 200 mL en erlemeyers de 250 mL y se les adicionó una concentración de carbón activado de 1 g/L; la mezcla se mantuvo en agitación constante en un agitador magnético. Se tomaron 9 alícuotas de 10 mL por vez, a diferentes periodos de tiempo entre el inicio y los 300 min de duración de los experimentos. Estas alícuotas se filtraron a través de papel filtro Whatman® 1. Los porcentajes de adsorción (%Ads) fueron calculados para los distintos tiempos de muestreo en base a la ecuación [1] (9):

$$\%Ads = \frac{C_i - C_t}{C_i} \times 100 \quad [1]$$

donde  $C_i$  es la concentración inicial del elemento contaminante ( $\mu\text{g/L}$ ) y  $C_t$  es la concentración del elemento contaminante ( $\mu\text{g/L}$ ) en el tiempo  $t$  (min).

Se midieron específicamente los contenidos de As y Pb durante las pruebas cinéticas, sin embargo, se hizo un análisis elemental completo al inicio y al final, luego de los 300 min de adsorción. Todos los análisis elementales en el agua se realizaron en un equipo ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer*) marca Thermo Fisher Scientific (USA) modelo X Series 2 ICP-MS.

La determinación de las propiedades antibacterianas de los materiales se realizó utilizando las siguientes cepas bacterianas fecales estandar gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Salmonella typhimurium* (ATCC® 14028™) y *Shigella flexneri* (ATCC® 12022™). Las cepas bacterianas se cultivaron en caldo Luria (Luria broth) a  $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$  por 24 h. Luego se centrifugaron por 15 min a 3500 rpm, y el sedimento resultante se resuspendió en 3 mL de solución salina fisiológica (0,9% NaCl); este procedimiento se realizó dos veces. A partir de las células lavadas en suspensión, se prepararon diluciones de 10 mL para obtener concentraciones de aproximadamente  $10^5$  UFC/mL para las tres cepas, de acuerdo al método del tubo de McFarland (con un 10% de variación), a las cuales se le agregaron 10 mg del material a evaluar. Las suspensiones se agitaron a temperatura ambiente por 2 h. Los conteos de los microorganismos viables de las cepas se realizaron cada 30 min hasta un tiempo de 120 min. Para ello se tomó 0,1 mL de la solución tratada y se diluyó para asegurar que el crecimiento de las colonias permitiera el conteo fácil y correcto. La solución diluida se sembró en 15 mL de agar Mueller-Hinton, y se incubó a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h. Cada evaluación se realizó por triplicado y los valores obtenidos se promediaron (11-13). Lo que se reportó en resultados corresponde a la eliminación de microorganismos a través del tiempo expresada en porcentaje (%) respecto de la concentración inicial de microorganismos.

## Resultados y discusión

### Caracterización de los carbones activados comerciales

En la Figura 1 se muestran las imágenes FESEM de los carbones activados comerciales estudiados. Para el caso del carbón activado A se identificaron dos tipos de estructuras: una de morfología irregular (que en la micrografía de menos magnificación se muestra algo triangular) correspondiente al carbón activado, y la otra de forma perfectamente esférica del orden de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro. En el caso de las partículas de carbón activado, estas mostraron una estructura altamente porosa con poros irregulares que estaban en el orden de 0,5 a 3,0  $\mu\text{m}$ , mientras que las esferas no presentaron porosidad, pero en su superficie se encontraron partículas de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  distribuidas homogeneamente.

La muestra B resultó altamente porosa, característica del carbón activado. Se observaron superficies con relieves escarpados sobre las cuales se reconocieron poros con un tamaño promedio de  $\sim 1 \mu\text{m}$  con formas irregulares. Además, se reconoció la presencia de pequeños trozos en la superficie del carbón los cuales, en base al análisis de EDX, se han identificado como trozos del mismo carbón y otros son impurezas que podrían provenir de la materia prima o de la interacción de los componentes de la materia prima durante el proceso de carbonización en la producción del material. Estas impurezas fueron compuestos a base de Al y Si.

La estructura del material C mostró una fibra de tejido que soportaba un material amorfo y poroso. Este material se conoce como tejido de carbón activado (*cloth activated carbon*) (14), constituido por fibras de un polímero (que por lo general es celulosa) cubiertas con carbón activado. Es posible apreciar cierta porosidad en los carbones activados, sin embargo, los poros no son tan prominentes como en los casos anteriores.

La muestra D presentó a baja magnificación la estructura rocosa típica del carbón activado. Este material se distinguió por mostrar una estructura porosa muy ordenada con formaciones tipo panal de abejas; la forma de los poros fue bastante regular y tipo ovoide.

Esta porosidad identificada en los carbones activados de los filtros comerciales analizados es importante desde el punto de vista de acceso de los agentes contaminantes (de naturaleza inorgánica y/o orgánica) del medio acuoso hacia el interior de los mismos y su contacto con los sitios activos de adsorción o agentes antimicrobianos que podrían contener estos materiales y a los que se debe su capacidad descontaminante.

La determinación elemental de algunas zonas superficiales de los materiales estudiados se realizó a través de EDS. La Figura 2 muestra los espectros obtenidos para las zonas indicadas en las imágenes respectivas. Así, se confirma que el material corresponde a una matriz de carbón que contiene Al como impureza (Figura 2a). La estructura esférica del material (Figura 2b) contiene elementos como K, Cl y Ag (Figura 2c); estos dos últimos con propiedades antibacterianas conocidas (15).

El material B está constituido básicamente por carbono (el cual fue extraído de la composición elemental, Figura 3), contiene elementos como Mg, Al, Fe, K y Si, los que podrían provenir básicamente de la composición de la materia prima precursora (que por lo general es carbón mineral) o del agente químico activador en el caso que haya sido activado químicamente.

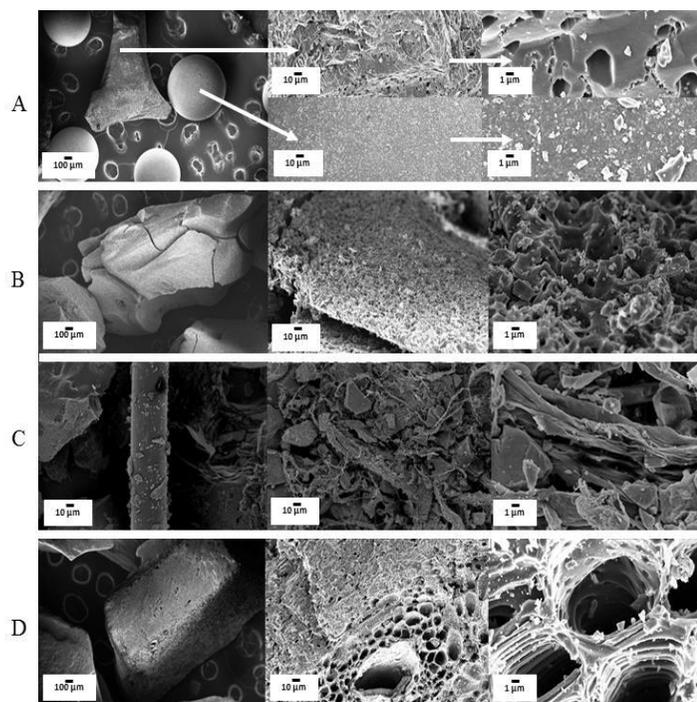


Figura 1. Micrografías de FESEM de las muestras de los materiales contenidos en los filtros comerciales A, B, C y D, tomadas a diferentes magnificaciones

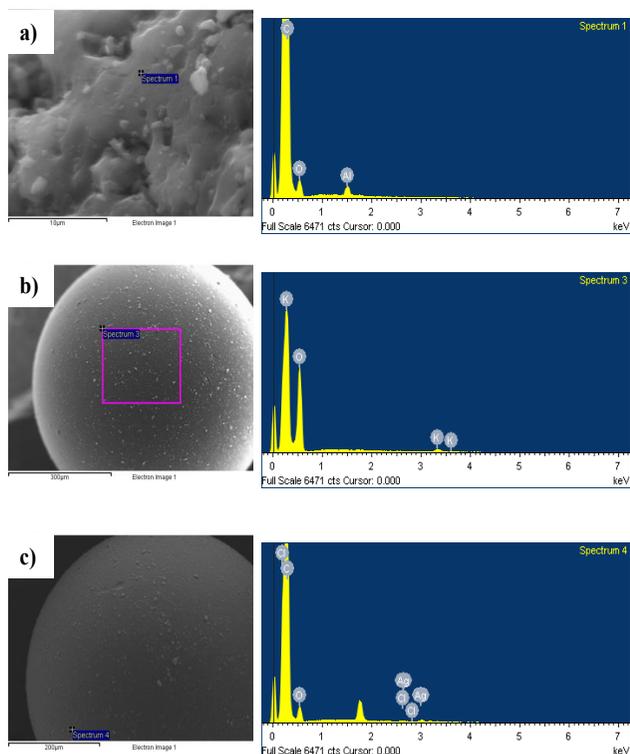


Figura 2. La micrografías a la izquierda muestran la region donde se realizó el análisis EDS de la muestra A, cuyos espectros se representan en las figuras de la derecha. La figura (a) muestra el análisis EDS de las partículas de carbón activado, mientras que las figuras (b) y (c) corresponde a distintas regiones de las partículas esféricas

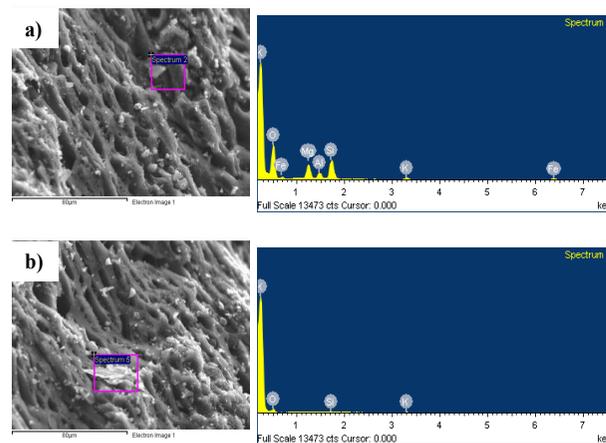


Figura 3. La micrografías a la izquierda muestran las dos regiones (a,b) donde se realizó el análisis EDS de la muestra B, cuyos espectros se representan en las figuras de la derecha

El material C (Figura 4a-c) muestra mayor cantidad de elementos entre los que se encuentran Cu, Si, P, S, Cl, Mg, Al y Ca, los cuales también podrían derivarse de la composición propia del agente precursor, así como de los posibles insumos químicos utilizados durante la producción del carbón.

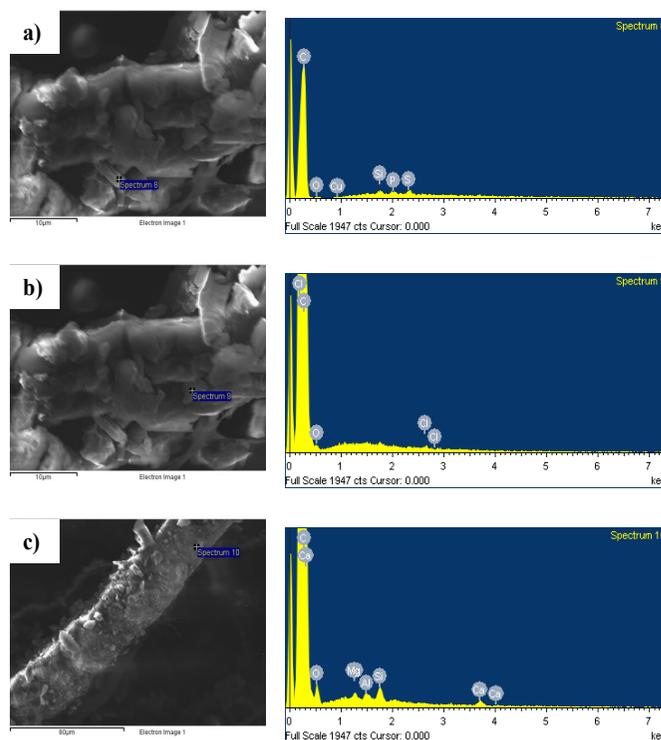
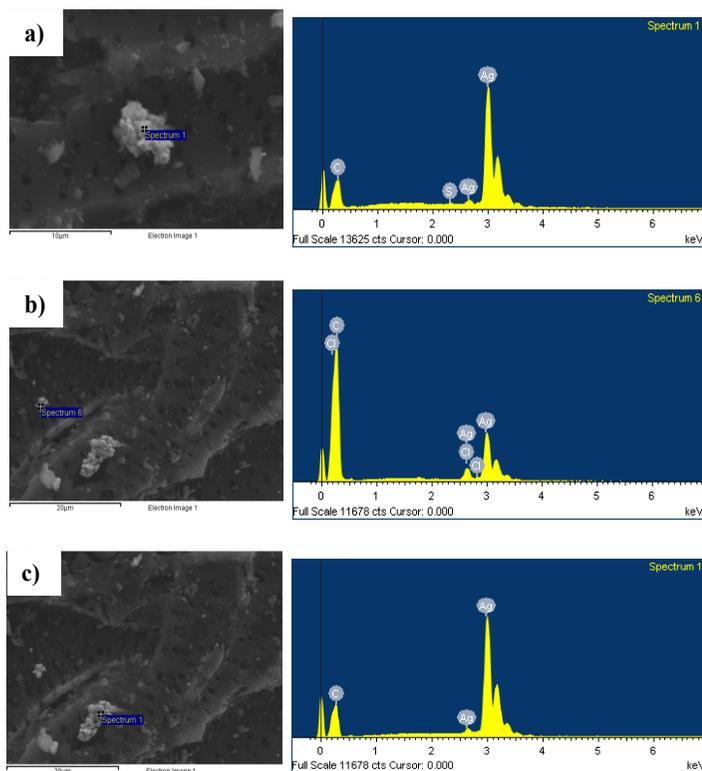


Figura 4. La micrografías a la izquierda muestran las tres regiones (a-c) donde se realizó el análisis EDS de la muestra C, cuyos espectros se representan en las figuras de la derecha

La composición de la muestra D se observa en la Figura 5a-c. En estas micrografías destaca la presencia de Ag que se presenta en forma de cúmulos cristalinos en la superficie de una matriz de carbón que corresponde al carbón activado. Adicionalmente se aprecia la presencia de S y Cl.



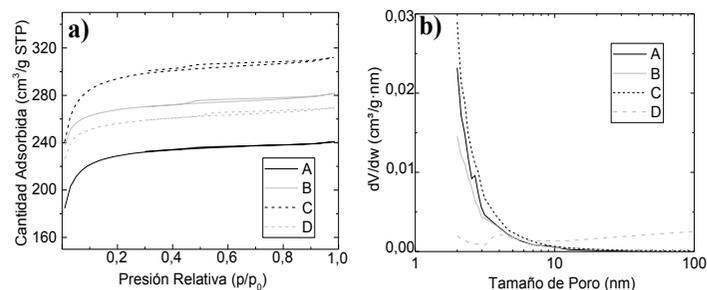
**Figura 5.** La micrografías a la izquierda muestran las tres regiones (a-c) donde se realizó el análisis EDS de la muestra B, cuyos espectros se representan en las figuras de la derecha

En la Tabla 1 se resumen los elementos, distintos de C y O, encontrados en los carbones activados analizados con EDS.

**Tabla 1.** Elementos (distintos de C y O) presentes en los materiales adsorbentes estudiados usando la técnica de EDS

Muestra de carbón	Elementos
A-Morfología irregular	Al
A-Morfología esférica	Ag, Cl, K
B	Al, Fe, K, Mg, Si
C	Al, Ca, Cl, Cu, Mg, P, S, Si
D	Ag, Cl, S

La Figura 6 muestra las isotermas de adsorción de  $N_2$  a 77 K (Fig. 6a) y la distribución de tamaño de poros en la región mesoporosa (Fig. 6b) para las muestras analizadas. Las isotermas de adsorción de nitrógeno de todos los carbones concuerdan con la forma de la isoterma tipo I(b) de acuerdo a la IUPAC (7) que corresponde a materiales con un amplio rango de poros que incluyen microporos cercanos a los 2 nm y mesoporos estrechos ( $\leq 2,5$  nm). Sin embargo, las isotermas presentan histéresis tipo H4, lo que hace suponer la presencia de mesoporos en la estructura. Esta histéresis es más notoria en el caso de los carbones B, C y D, mientras que en la muestra A es menos perceptible.



**Figura 6.** (a) Isotermas de adsorción de nitrógeno (77 K) y (b) distribución de poros en la región mesoporosa de las muestras analizadas

La Figura 6b muestra la distribución de mesoporos en los materiales estudiados. Las muestras A, B y C presentan una distribución de poros similar con una mayor cantidad de poros con tamaños entre 2 y 10 nm, mientras que en la muestra D la cantidad de poros está casi homogéneamente distribuida en todo el rango mesoporoso (2–50 nm). Incluso en la muestra D se muestra mayor cantidad de poros en la región macroporosa (mayor de 50 nm) comparado con el resto de muestras, coincidiendo con las micrografías de microscopía electrónica de la muestra en cuestión (Figura 1).

En la Tabla 2 se muestran los valores medidos de las propiedades texturales de los materiales estudiados. Todos los materiales mostraron valores de área superficial menores de  $1000 \text{ m}^2/\text{g}$ . Los valores obtenidos de la razón entre el área mesopora respecto al área específica total ( $\frac{S_{meso}}{S_{BET}}$ ) y la razón del volumen de microporos respecto al volumen total de poros ( $\frac{V_{micro}}{V_{net}}$ ) de los materiales estudiados verifica lo mencionado respecto de la naturaleza principalmente microporosa de las muestras con presencia de mesoporos.

**Tabla 2.** Propiedades texturales y valores de pH del punto de carga cero ( $\text{pH}_{PZC}$ ) de los carbones activados estudiados

Muestra	$S_{BET}$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	$S_{meso}$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	$\frac{S_{meso}}{S_{BET}}$ (%)	$V_{net}$ ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) <sub>liq</sub>	$V_{micro}$ ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) <sub>liq</sub>	$\frac{V_{micro}}{V_{net}}$ (%)	$\text{pH}_{PZC}$
A	705	43	6,1	0,37	0,34	91,9	5,2
B	816	39	5,0	0,44	0,40	90,9	6,2
C	906	58	6,4	0,48	0,43	89,6	7,0
D	780	44	5,6	0,42	0,39	92,9	7,0

El punto de carga cero, además de indicar el valor de pH donde la carga del material es igual a cero a nivel de su superficie interna y externa, indica el carácter ácido o básico de los materiales relacionado con la naturaleza de los grupos funcionales (16). De acuerdo a los valores de la Tabla 2, para este parámetro los carbones C y D presentan un carácter neutro, mientras que el carbón B un carácter ligeramente ácido y el carbón A un carácter ácido.

Los difractogramas de rayos X de los materiales provenientes de los filtros comerciales se muestran en la Figura 7. Los picos anchos que se observan y que están aproximadamente en  $23^\circ$  y  $42^\circ$  corresponden a los planos (002) y (101) correspondientes al grafito (17).

Los picos anchos de difracción sugieren que la muestra tiene una estructura muy desordenada y amorfa. Se observa que la muestra A es amorfa y tiene el pico ancho correspondiente al carbón activado superpuesto a otro pico ancho que aparece en  $18^\circ$ , este puede ser correspondiente a las esferas que se observan por microscopía electrónica. Las muestras B y C son amorfas, mientras que la muestra D, además de los picos anchos correspondientes al carbón activado, presenta los picos característicos de la Ag metálica (identificado con \*) (18).

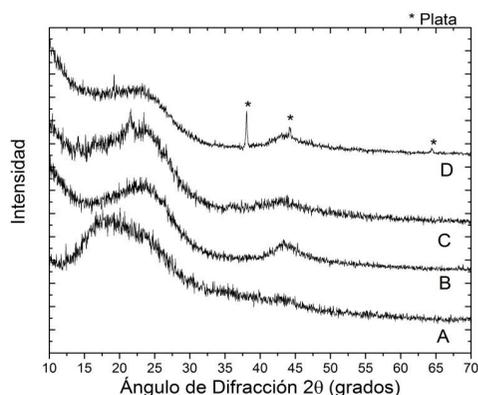


Figura 7. Difractogramas de rayos X de los materiales provenientes de los filtros comerciales A, B, C y D

A pesar de que la muestra A contiene Ag de acuerdo al análisis de EDS, al parecer las cantidades de este elemento son menores del límite de detección de la difracción de rayos X, que corresponde a contenidos mayores a 1% *p/p* de los compuestos cristalinos presentes en la muestra.

### Adsorción de metales pesados por los materiales estudiados

El porcentaje de adsorción de As y de Pb obtenido con todos los materiales se muestra en la Figura 8. Específicamente para el caso del As (Figura 8a) se obtuvo una remoción cercana al 100% a los 10 min. Para el caso del Pb (Figura 8b) las muestras de carbones B, C y D también alcanzaron valores de remoción cercanos al 100% en menos de 10 min. Sin embargo, en el caso de la muestra A el porcentaje de remoción fue cercano a 80% en los primeros 5 min, luego disminuyó hasta los 50 min para finalmente aumentar progresivamente y llegar a un valor cercano a 100% a los 300 min.

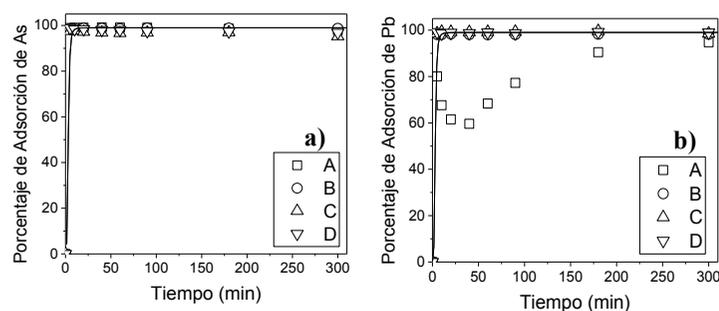


Figura 8. Porcentaje de adsorción de As (a) y Pb (b) contenido en el agua del Río Tumbes utilizando los materiales comerciales estudiados A, B, C y D

El pH es un factor relevante sobre los estados de oxidación en el que se encuentran presentes los metales, así como sobre las propiedades superficiales del adsorbente, de ahí que influya en el porcentaje de adsorción (19). En la Figura 9 se muestra el comportamiento del pH durante el experimento de adsorción, así como los valores de  $pH_{PZC}$  para cada muestra de carbón. Para el caso de los carbones activados B, C y D los valores de pH aumentaron ligeramente respecto del valor inicial 6, llegando en algunos casos hasta valores  $\sim 7$ , mientras que para la muestra A el valor de pH se redujo respecto del pH inicial hasta valores  $\sim 4$ .

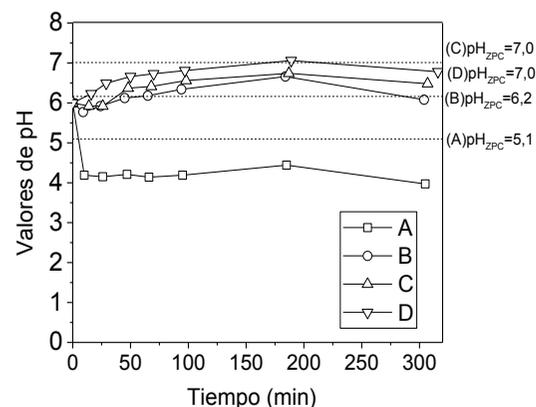


Figura 9. Comportamiento del pH durante los experimentos y los respectivos  $pH_{PZC}$  de los materiales estudiados A, B, C y D

Cuando el pH de la solución se encuentra por debajo del  $pH_{PZC}$  del carbón activado, la carga neta es predominantemente positiva, favoreciendo la adsorción de aniones, pero cuando el pH es superior al valor del  $pH_{PZC}$ , la carga neta del carbón es negativa favoreciendo la adsorción de cationes (19). Sin embargo, cuando el pH de la solución está cerca del valor del  $pH_{PZC}$ , el carbón presenta carga neutra, pudiendo adsorber tanto aniones como cationes. Este hecho permitiría explicar la situación particular del comportamiento del porcentaje de adsorción de Pb por parte de la muestra de carbón A. De acuerdo a las condiciones de las soluciones utilizadas en las pruebas de adsorción de Pb, se encuentra como catión  $Pb^{2+}$  (20) y el carbón tendría una carga neta positiva. Por esto, debido a la repulsión electrostática entre la superficie del carbón y el catión  $Pb^{2+}$ , se dificulta la adsorción del mismo.

Como se muestra para los carbones B, C y D el cambio del pH osciló a un nivel cercano de sus respectivos  $pH_{PZC}$ , por lo que fueron capaces de adsorber el catión  $Pb^{2+}$  y el anión arsénico ( $AsO_4^{3-}$ ), el cual en las condiciones del experimento se encontraría como oxianiones negativos (21).

Otro de los factores a tener en cuenta en los procesos de adsorción es la caracterización textural de los materiales adsorbentes. En este caso todos los materiales son micro-mesoporosos, característica que permite facilitar el acceso del agua de río con los contaminantes hacia los sitios activos de los materiales para su adsorción; una menor área superficial denota una menor presencia de sitios activos para la adsorción de contaminantes. En este sentido, el carbón A presenta la menor área superficial específica, área mesoporosa y volumen de poros, respecto a los demás carbones. Esto reduce la posibilidad de acceso del agua hacia los sitios activos, así como también disminuye la presencia de sitios activos de adsorción sobre su superficie. Este factor, junto a la relación del pH de la solución (agua del río) durante los experimentos y el  $pH_{PZC}$  de la muestra, explicarían la menor adsorción de As por parte de la muestra.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la caracterización inicial del agua contaminada del Río Tumbes y de las diferentes muestras de agua luego de los 300 min de duración de los experimentos de adsorción acorde al material utilizado. Se observa que las concentraciones de As y Pb son reducidas en todos los casos hasta valores cercanos o por debajo del estándar de calidad de agua (Categoría A y Subcategoría A1, 10 µg para los dos elementos) (5).

La cantidad de Al en la muestra inicial de agua del Río Tumbes fue de 1750 µg/L, un nivel más alto del estipulado en la normatividad (900 µg/L), sin embargo, todos los materiales en las condiciones experimentales redujeron el nivel de Al hasta niveles menores al estipulado en la norma.

Para el caso del Fe, el valor inicial estuvo por encima del estándar de calidad de agua, sin embargo, la mayoría de materiales, a excepción del A, redujeron su concentración hasta valores por debajo de este estándar.

A pesar de que el carbón A redujo los niveles de Al y Fe, siendo cationes a las condiciones del experimento, la remoción de estos metales resultó ser de solo 26,3 y 17,4 %, respectivamente. Esto corrobora lo antes mencionado respecto a que la carga superficial neta del carbón A es positiva y la adsorción de cationes se ve limitada por las fuerzas de repulsión.

**Tabla 3.** Contenido de metales pesados y de otras especies metálicas presentes en el agua del Río Tumbes después de un tiempo de contacto de 300 min con los materiales adsorbentes estudiados

Elemento	Concentración en el agua inicial (µg/L)	Concentration final (µg/L)				ECA(*) (µg/L)
		A	B	C	D	
Al	1750	460	27	48,8	49,3	900
As	56,7	1,2	0,7	2,7	1,8	10
B	93	95,1	95,6	93,7	95,1	700
Ba	72	44,1	54,7	66,1	68,8	700
Be	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	12
Cd	2,2	0,83	1,2	1,0	1,4	3
Cr	2,9	0,84	<0,4	<0,4	<0,4	50
Cu	207	49	10	5,6	6,7	2000
Fe	2920	508	14,6	59,4	28,3	300
Hg	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	1
Mn	229	201	198	191	216	400
Ni	4	3,2	2,1	2,2	2,9	70
Pb	224	11,7	3,9	3,3	2,3	10
Se	1,7	0,45	0,68	1,1	0,97	40
Sn	0,54	<0,2	<0,1	<0,2	<0,2	<0,2
U	0,25	0,034	<0,02	<0,02	<0,02	20
V	4,8	<0,3	<0,3	0,57	0,45	--
Zn	272	323	201	169	265	3000

(\*) Estándar de Calidad de Agua (Categoría A-Aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable, Subcategoría A1-Aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección) (6)

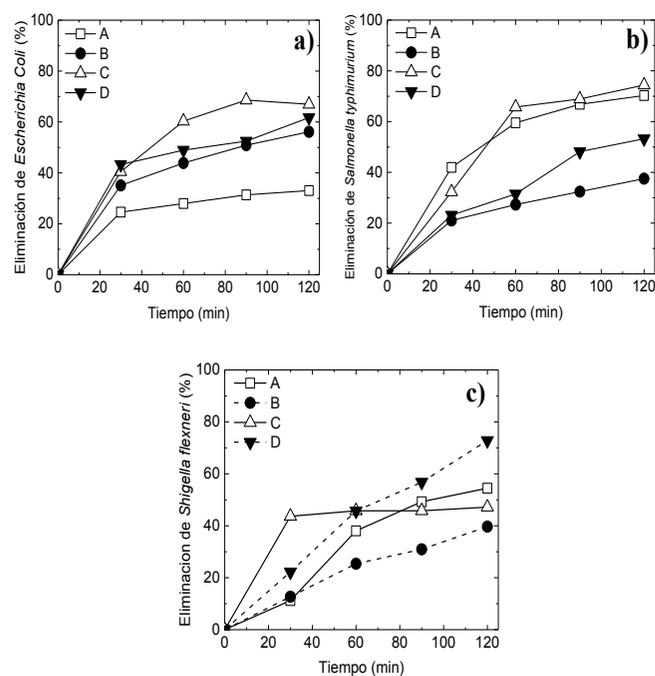
### Capacidad antibacteriana de los materiales

Los resultados de las pruebas antibacterianas de los materiales evaluados se muestran en la Figura 10. Aquí se puede apreciar la reducción en la carga microbiana luego de diferentes tiempos de siembra 0, 30, 60, 90 y 120 min. Es evidente que, en general, la carga microbiana se redujo a medida que el tiempo de contacto entre los materiales (basicamente carbones activados) y la solución de microorganismos aumentaba.

En la Figura 10a se muestra el comportamiento de las cuatro muestras estudiadas en contacto con *Escherichia coli*. Es evidente que la muestra C tiene la mayor efectividad para la eliminación de esta cepa, llegando hasta valores de eliminación cercanos a 70% después de 120 min. Luego le siguen la muestra D, B y finalmente A en orden decreciente de efectividad. Así, para el caso de la muestra A se alcanzaron valores de eliminación de *Escherichia coli* que no superaron el 30%. En ninguno de los casos se llega a una condición de equilibrio, sin embargo, el carbón A se aproximó a ese comportamiento después de 120 min.

Los niveles de eliminación de la cepa *Salmonella typhimurium* se presentan en la Figura 10b. Se observa que los materiales C y A mostraron comportamientos similares y con niveles de remoción superiores a 70% después de 120 min. El carbón D mostró valores de eliminación cercanos al 50%, mientras que el material B solo presentó niveles que apenas superaron el 30% de eliminación después de 120 min.

Finalmente, la Figura 10c muestra los niveles de eliminación de la cepa *Shigella flexneri* para los materiales analizados. Se observa que la muestra D alcanza aproximadamente un 70% de eliminación a los 120 min y además se observa que el incremento de la remoción se desarrolla en forma casi lineal. Este comportamiento lineal también se presentó para el material B, pero su máxima remoción no superó el 40% a los 120 min. La muestra C presentó un máximo de remoción a los 30 min con un valor ligeramente mayor a 40%.



**Figura 10.** Remoción de bacterias fecales estándar gram negativas: (a) *Escherichia coli*, (b) *Salmonella typhimurium*, (c) *Shigella flexneri* en porcentaje (%) para las cuatro muestras de filtros comerciales (A, B, C y D)

En general, las muestras de carbón activado C y D mostraron mejor capacidad antibacteriana frente a las cepas de enterobacterias estudiadas. Para la muestra C la capacidad antibacteriana se basaría en la presencia de Cl, Cu y Si que conforman parte de su composición superficial; el Cl y el Cu son elementos con capacidad antibacteriana demostrada (22, 23). La capacidad antibacteriana del Cl reside en sus propiedades antioxidantes moderadas y la reacción del mismo con componentes de las células microbianas, como lípidos y proteínas (22), mientras que los mecanismos que le confieren actividad antibacteriana al Cu no han sido claramente delucidados. En relación con el Si, también se han demostrado sus propiedades antibacterianas, basadas en la inducción de estrés oxidativo debido a que el Si es una especie reactiva de oxígeno (24). En este compuesto también se basaría la capacidad antibacteriana de la muestra de carbon B.

En el caso de la muestra D, la capacidad antibacteriana se basaría en la presencia de partículas de Ag soportadas en la superficie del carbón activado, tal como se observa en los espectros EDS. La muestra A también tendría Ag en su composición, pero en cantidades menores a la muestra D. Por esta razón, sólo se detectan trazas en los análisis de EDS, en los análisis de rayos X no es posible la detección. La capacidad antibacteriana de la Ag ha sido demostrada anteriormente (25). El mecanismo en el cual se sustenta esta actividad de la Ag se basa en el efecto desnaturador de los iones de Ag sobre las moléculas de ADN y la inactivación del grupo tiol de las proteínas (26). La mayor capacidad antibacteriana de la muestra de carbón C sobre el carbón D que contiene Ag en algunos casos, se basaría en el posible efecto combinado por la presencia de Cl, Cu y Si.

## Conclusiones

Se caracterizaron cuatro muestras de carbones activados (A, B, C y D) extraídos de filtros comerciales utilizados para el tratamiento del agua y se evaluó su porcentaje de adsorción de metales pesados presentes en el agua del Río Tumbes – Perú y su capacidad de eliminación de microorganismos. Todas las muestras mostraron gran área superficial (entre 705 y 906 m<sup>2</sup>/g) y contaban con estructura micro y mesoporosa desarrollada, además, fueron amorfas. Solo la muestra D presentó picos asignados a Ag metálica. Se determinaron diferentes morfologías en los carbones, además de la presencia de poros en las muestras A, B y D. En la muestra A se identificó la presencia de un material de geometría esférica (con un diámetro ~500 µm) conteniendo Cl, Ag y K. La muestra C mostró ser un tejido de carbón activado, con fibras que soportan partículas de carbón.

De la evaluación de los experimentos de adsorción de los materiales analizados se determinó que para el caso del As y del Pb, cuyas concentraciones iniciales en el agua contaminada fueron 56,7 y 224,0 µg/L, respectivamente, el porcentaje de adsorción fue cercano al 100%. Las propiedades texturales y la relación entre el pH<sub>PZC</sub> de los carbones y el pH del agua del río durante los experimentos tuvieron influencia en el proceso de adsorción.

Por otro lado, la capacidad antibacteriana fue evaluada satisfactoriamente frente a las siguientes cepas fecales de bacterias gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Salmonella typhimurium* (ATCC® 14028™) y *Shigella flexneri* (ATCC® 12022™). Esta capacidad se basa en la presencia superficial en los carbones de Ag, Cu, Cl y/o Si. Los materiales estudiados son de potencial uso en el tratamiento del agua del Río Tumbes, en orden descendente de efectividad los materiales C, B, D y A.

## Agradecimientos

La Universidad Nacional de Tumbes contribuyó con un importante apoyo económico (Proyecto Canon – Resolución N° 0722-2014/UNT-R) para la ejecución de la presente investigación. El agradecimiento también a la Academia de Finlandia por el financiamiento a través del proyecto AdMatU (DNo: 269631). Uno de nosotros (M.M.G.L.) agradece a la Universidad Nacional de Ingeniería por la financiación recibida como docente investigador.

## Referencias

- Bermejo, L.; Cruz, G. Metales pesados en los suelos cultivados con arroz en la margen izquierda del Río Tumbes. *Revista Manglar*. **2006**, 4 (1), 15-23.
- Autoridad Nacional del agua. <http://www.ana.gob.pe:8093/informacion-relevante/calidad-del-agua.aspx>. (Consultado 22 de diciembre del 2015).
- Ministerio del Ambiente. <http://www.sinia.minam.gob.pe/download/file/fid/37571>. (Consultado 22 de diciembre del 2015).
- Yoshida, T.; Yamauchi, H.; Sun, G.F. Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose–response relationships in review. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2004**, 198 (3), 243–252. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.10.022>.
- Ministerio del Ambiente. <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2015/12/Decreto-Supremo-N%C2%B0-015-2015-MINAM.pdf>. (Consultado 18 de agosto del 2016).
- Pulido, M.D.P.A.; de Navia, S.L.Á.; Torres, S.M.E.; Prieto, A.C.G. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova*. **2005**, 3 (4), 69-79. DOI: <https://doi.org/10.22490/24629448.338>.
- Thommes, M.; Kaneko, K.; Neimark, A. V.; Olivier, J. P.; Rodriguez-Reinoso, F.; Rouquerol, J.; Sing, K. S. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure Applied Chem.* **2015**, 87 (9-10), 1051-1069. DOI: <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>.
- ASTM- D-6556-10 Standard Test Method for Carbon Black-Total and External Surface Area by Nitrogen Adsorption. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1520/D6556-16>.
- Cruz, G.J.F.; Matějová, L.; Pirlä, M.; Ainassaari, K.; Canepa, C.A.; Solis, J.; Keiski, R.L. A comparative study on activated carbons derived from a broad range of agro-industrial wastes in removal of large-molecular-size organic pollutants in aqueous phase. *Water, Air, Soil Pollut.* **2015**, 226 (7), 1-15. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2474-7>.
- Khenniche, L.; Aissani, F. Characterization and utilization of activated carbons prepared from coffee residue for adsorptive removal of salicylic acid and phenol: Kinetic and isotherm study. *Desalin. Water Treat.* **2009**, 11 (1-3), 192-203. DOI: <https://doi.org/10.5004/dwt.2009.801>.
- Srinivasan, N.R.; Shankar, P.A.; Bandyopadhyaya, R. Plasma treated activated carbón impregnated with silver nanoparticles for improved antibacterial effect in water disinfection. *Carbon*. **2013**, 57, 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.01.008>.

12. Ortiz-Ibarra, H.; Casillas, N.; Soto, V.; Barcena-Soto, M.; Torres-Vitela, R.; de la Cruz, W.; Gómez-Salazar, S. Surface characterization of electrodeposited silver on activated carbon for bactericidal purposes. *J. Colloid. Interface Sci.* **2007**, *314* (2), 562-571. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.05.062>.
13. Zhang, S.; Fu, R.; Wu, D.; Xu, W.; Ye, Q.; Chen, Z. Preparation y characterization of antibacterial silver-dispersed activated carbon aerogels. *Carbon.* **2004**, *42*, 3209-3216. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2004.08.004>.
14. Hoda, N.; Bayram, E.; Ayranci, E. Kinetic and equilibrium studies on the removal of acid dyes from aqueous solutions by adsorption onto activated carbon cloth. *J. Hazar. Mater.* **2006**, *137* (1), 344-351. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.02.009>.
15. Marambio-Jones, C.; Hoek, E.M. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanopart. Res.* **2010**, *12* (5), 1531-1551. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>.
16. Boehm, H.P. Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment. *Carbon.* **2002**, *40* (2), 145-149. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0008-6223\(01\)00165-8](https://doi.org/10.1016/s0008-6223(01)00165-8).
17. Acharya, J.; Sahu, J. N.; Mohanty, C. R.; Meikap, B. C. Removal of lead(II) from wastewater by activated carbon developed from Tamarind wood by zinc chloride activation. *Chem. Eng. J.* **2009**, *149* (1-3), 249-262. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.10.029>.
18. Philip, D. Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles using edible mushroom extract. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **2009**, *73* (2), 374-381. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.02.037>.
19. Mohammadi, S.Z.; Karimi, M.A.; Afzali, D.; Mansouri, F. Removal of Pb (II) from aqueous solutions using activated carbon from Sea-buckthorn stones by chemical activation. *Desalination.* **2010**, *262* (1-3), 86-93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.05.048>.
20. Takeno, N. Atlas of Eh-pH diagrams: Intercomparison of thermodynamic databases. Geological survey of Japan open file report No. 419. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. Research Center for Deep Geological Environments: Japan, 2005; p. 102.
21. Pattanayak, J.; Mondal, K.; Mathew, S.; Lalvani, S.B. A parametric evaluation of the removal of As (V) and As (III) by carbon-based adsorbents. *Carbon.* **2000**, *38* (4), 589-596. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0008-6223\(99\)00144-x](https://doi.org/10.1016/s0008-6223(99)00144-x).
22. Kim, J.; Pitts, B.; Stewart, P.S.; Camper, A.; Yoon, J. Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52* (4), 1446-1453. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00054-07>.
23. Ruparelia, J.P.; Chatterjee, A.K.; Duttgupta, S.P.; Mukherji, S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta biomater.* **2008**, *4* (3), 707-716. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>.
24. Zhang, W.; Li, Y.; Niu, J.; Chen, Y. Photogeneration of reactive oxygen species on uncoated silver, gold, nickel, and silicon nanoparticles and their antibacterial effects. *Langmuir.* **2013**, *29* (15), 4647-4651. DOI: <https://doi.org/10.1021/la400500t>.
25. Shahverdi, A.R.; Fakhimi A.; Shahverdi, H.R.; Minaian, S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* **2007**, *3* (2), 168-171. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.02.001>.
26. Feng, Q.L.; Wu, J.; Chen, G.Q.; Cui, F.Z.; Kim, T.N.; Kim, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed Mater.* **2000**, *52* (4), 662-668. DOI: [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4<662::aid-jbm10>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::aid-jbm10>3.0.co;2-3).

**Article citation:**

Silupú, C. R.; Solís, R. L.; Cruz, G. J. F.; Gómez, M. M.; Solís, J. L.; Keiski, R. L. Caracterización de filtros comerciales para agua a base de carbón activado para el tratamiento de agua del río Tumbes - Perú. *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, *46* (3), 37-45. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n3.62146>.

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 y debe especificar cuál fue el aporte de cada autor a la elaboración del manuscrito.

Al firmar, los autores declaran ser los responsables de la elaboración del documento, por tanto, no se permitirá eliminar autores a lo largo del proceso editorial. De presentarse alguna novedad, podrá permitirse la adición de un autor adicional siempre que se justifiquen adecuadamente los motivos de su incorporación. La solicitud de adición de un autor no garantiza que se acepte su incorporación, cada caso se evaluará por el comité editorial.

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.

## Información de los autores

- 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 Urbina<sup>1\*</sup>

<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)

## 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, Resumen, 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**. Como estrategia para aumentar la difusión y visibilidad de los resultados se sugiere presentar los manuscritos en inglés.

Los manuscritos que no cumplan con el formato de la Revista serán devueltos sin pasar por evaluación.

## 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.

### 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

Una vez haya finalizado el proceso de revisión por pares, el editor enviará un correo electrónico al(os) autor(es) del manuscrito junto a las sugerencias, indicaciones y comentarios que cada evaluador efectuó sobre los aspectos de fondo y de forma del artículo. Según el concepto de los evaluadores el manuscrito podrá ser rechazado o se solicitará una segunda versión.

En el segundo caso, para continuar con el proceso de publicación el(los) autor(es) deben enviar los siguientes archivos por medio de la página de la Revista (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim>) desde su rol de *Autor*:

- 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.

Seguidamente el editor verificará la nueva versión y le notificará al (os) autor(es) la decisión: aceptación o rechazo.

## 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. This cover letter must be signed by all authors and must specify the contribution of each author to the preparation of the manuscript.

By signing, the authors declare that they are responsible for the preparation of the document, therefore, it will not be allowed to eliminate authors throughout the editorial process. The addition of an additional author may be allowed if the reasons for its incorporation are adequately justified. The request for addition of an author does not guarantee that the incorporation is accepted, each case will be evaluated by the editorial committee.

3. The version of the online document should not include any data of authorship, institutional affiliation or acknowledgments 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 minimum. 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.

## Authors information

- 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. Remember that in the first submission through the website, this information should be included in a separate file, not in the manuscript, the editorial team will include it in the article when it passes the evaluation process. 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)

## 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, Resumen, 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.

### 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

---

Once the peer review process is completed, the editor will send an email to the author(s) of the manuscript along with the suggestions, indications and comments that each evaluator made on the format and content of the article. According to the concept of the evaluators the manuscript may be rejected or a second version will be requested.

In the second case, to continue with the publication process, the author(s) should send the following files through the Journal page (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim>) from its role of *Author*:

- 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 the mentioned format.

The editor will then verify the new version and notify the author(s) of the decision: acceptance or rejection.

## Cost of publication

---

The publication of an article, with an extension not exceeding 3 printed pages of the magazine, 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

Diseño y producción de diversas proteínas fusión de la nicotinamidaqunicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT) de *Plasmodium falciparum*

Design and production of various fusion proteins of the nicotinamidequnicotinate mononucleotide adenilil transferase (NMNAT) of *Plasmodium falciparum*

Desenho e produção de várias proteínas fusão da nicotinamidaqunicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT) do *Plasmodium falciparum*

Carlos A. Nieto C., Nicolás Forero B., María H. Ramírez H.

5-10

Composición fitoquímica del extracto de raíz de *Ichthyothere terminalis* de dos regiones geográficas de Colombia

Phytochemical composition of the root extract of *Ichthyothere terminalis* from two geographical regions in Colombia

Composição fitoquímica do extracto de raiz de *Ichthyothere terminalis* de duas regiões geográficas da Colômbia

Luz Yineth Ortiz-Rojas, Giovanni Chaves-Bedoya

11-16

Synthesis of acyl-hydrazone from usnic acid and isoniazid and its anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity

Síntesis de acil-hidrazona a partir del ácido úsnico e isoniazida y su actividad anti-*Mycobacterium tuberculosis*

Síntese de acilhidrazona a partir de ácido úsnico e isoniazida e sua atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*

Melissa Barrera Tomas, Gloria Eva Tomas Chota, Patricia Sheen Cortavarría, Patricia Fuentes Bonilla, Miguel Angel Inocente Camones, Julio Santiago Contreras

17-21

Alcaloides aporfínicos con actividad antituberculosa aislados de *Ocotea discolor* Kunth (Lauraceae)

Aporphine alkaloids with antitubercular activity isolated from *Ocotea discolor* Kunth (Lauraceae)

Alcalóides aporfirínicos com atividade antituberculosa isolados de *Ocotea discolor* Kunth (Lauraceae)

Lady T. Albarracín, Oscar J. Patiño, Juan D. Guzman, Neelu Begum, Timothy D. McHugh, Luis E. Cuca, Mónica C. Ávila

22-27

### Química Aplicada y Analítica

Nanopartículas de CuO y su propiedad antimicrobiana en cepas intrahospitalarias

CuO nanoparticles and their antimicrobial activity against nosocomial strains

Nanopartículas de CuO e sua propriedade antimicrobiana frente a cepas intrahospitalares

L. Esmeralda Román, Flavia Castro, Dora Maúrtua, Cesar Condori, Darwin Vivas, Ana E. Bianchi, Francisco Paraguay-Delgado, José L. Solís, Mónica M. Gómez

28-36

Caracterización de filtros comerciales para agua a base de carbón activado para el tratamiento de agua del río

Tumbes-Perú

Characterization of water commercial filters based on activated carbon for water treatment of the Tumbes river-Peru

Caracterização de carvão ativado de filtros comerciais para tratamento da água do rio Tumbes-Perú

Carmen R. Silupú, Rosa L. Solís, Gerardo J. F. Cruz, Mónica M. Gómez, José L. Solís, Riitta L. Keiski

37-45

Guía para autores  
Guide for authors

46-53

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 Access 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)

ISSN 0120-2804



9 770120 280002