



Revista Colombiana de Química

Volumen 47, No. 3, septiembre - diciembre de 2018



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 por CrossRef.org: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim>

Indizada en

Publindex- Índice Bibliográfico Nacional
Chemical Abstracts
SciELO Colombia
Scopus Q4 (SJR/2016: 0,12)
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

Consulta Open Access

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/index>
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0120-2804
<http://www.redalyc.org/revista.oe?id=3090>

Director revista

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

Comité Editorial

Cristian Blanco Tirado, Ph.D., Universidad Industrial de Santander, Colombia.
Francisco Carrasco Marín, Dr. Sc., Universidad de Granada, España.
Leonardo Castellanos Hernández, Dr. Sc., Universidad Nacional de Colombia
Pedro Joseph-Nathan, Dr. Sc., Instituto Politécnico Nacional, México.
Sonia Moreno Guáqueta, Dr. Sc., Universidad Nacional de Colombia.
Cristian Ochoa Puentes, Dr. rer. nat., Universidad Nacional de Colombia.
Juscelino Tovar, Dr. Sc., Universidad de Lund, Suecia.

Comité Científico

Gustavo Adolfo González Aguilar, Dr. Sc., Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, México.
Ljubisa R. Radovic, Dr. Sc., Pensilvania State University, USA.
Héctor Fabio Zuluaga Corrales, Dr. Sc., Universidad del Valle, Colombia.
Ajjamada Kushalappa, Ph. D., McGill University, Canadá.

Suscripciones y canje

Todos los ejemplares de la Revista Colombiana de Química se encuentran disponibles en sus sitios web (portal de Revistas UN, SciELO y Redalyc). El contenido se encuentra bajo una licencia de Creative Commons tipo Atribución Internacional ([CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)) que permite el acceso abierto con cualquier fin, siempre que se de el reconocimiento apropiado.

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 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.
Fotografía: Jhon Cañón
Diseño y maquetación: Sindy Tatiana Bedoya Mesa.
Impresión y encuadernación: Proceditor Ltda

Carta del editor
Editor's letter

4

Química Orgánica y Bioquímica

Estudio de la capacidad de absorción en hidrogeles semi-interpenetrados de poliacrilamida/poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

Study of the absorption capacity in semi-interpenetrating hydrogels of polyacrylamide/poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)

Estudo da capacidade de absorção em hidrogéis semi-interpenetrados de poliacrilamida/poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

Nain González, Amal El-Halah, Jesús M. Contreras, Blanca Rojas de Gascue

5-12

Optimización de la síntesis de aldehído canfolénico a partir del epóxido de α -pineno con Cu/MCM-41

Optimization of the synthesis of campholenic aldehyde from α -pinene epoxide with Cu/MCM-41

Optimização da síntese de aldeído camfolênico desde epóxido de α -pineno com Cu/MCM-41

Julián Eduardo Sánchez Velandia, Aída Luz Villa Holguín

13-23

Purificación del fibrinógeno gamma A/gamma prima ($\gamma A/\gamma'$) por cromatografía líquida rápida de proteínas

Purification of fibrinogen gamma A/gamma prima ($\gamma A/\gamma'$) by fast protein liquid chromatography

Purificação do fibrinogênio gamma A/gamma prima ($\gamma A/\gamma'$) por cromatografia líquida rápida de proteínas

Miriam Elena Cantero Guevara, Bárbara Cardinali, Rita Marchi

24-30

Química Aplicada y Analítica

Adsorción-desorción de diurón y ametrina en suelos de Colombia y España

Adsorption-desorption of diuron and ametryn in Colombian and Spanish soils

Adsorção-desorção de diuron e ametrina nos solos da Colômbia e da Espanha

Yemy Rocío Peña-Martínez, Jairo Arturo Guerrero-Dallos, María José Martínez-Cordón

31-40

Desarrollo de un método analítico de preparación de muestras de alimentos para determinar óxidos de colesterol (COPs) mediante cromatografía

Development of an analytical method of food samples preparation to determine cholesterol oxides (COPs) by chromatography

Desenvolvimento de um método analítico de preparação de amostras de alimentos para determinar óxidos de colesterol (COPs) por meio de cromatografia

Juan José Lozada Castro, Mercedes Figueroa Macca

41-51

Fisicoquímica e Inorgánica

Modelos matemáticos de parámetros reológicos y su influencia en el sistema de bombeo de fluidos no newtonianos

Mathematical models of rheological parameters and their influence on the pumping system of non-Newtonian fluids

Modelos matemáticos de parámetros reológicos e sua influência no sistema de bombeamento de fluidos não-newtonianos

Gabriel Hernández Ramírez, Aristidez A. Legrá-Lobaina, Liliana Rojas Hidalgo, Beatriz Ramírez-Serrano, Armín Mariño Pérez

52-60

El tercer número del volumen 47 del año 2018 de la Revista Colombiana de Química cuenta con la participación de distintos autores nacionales e internacionales. Las contribuciones provienen de autores nacionales de las ciudades de Santa Marta, Montería, Medellín, Bogotá, Pasto y Cali. Los autores internacionales provienen de Mérida, Sucre y Caracas (Venezuela), Génova (Italia) y Moa y La Habana (Cuba). A continuación se presenta el contenido del número.

En la sección de Orgánica y Bioquímica incluimos tres artículos. En el primer artículo se sintetizaron algunos hidrogeles semi-interpenetrados (semi-IPN) formados a partir de acrilamida (PAAm) y del biopolímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) [P(HB-co-HV)] con el fin de evaluar el efecto, por un lado, de la composición de PAAm/biopolímero y, por otro, del porcentaje de reactivo entrecruzante (MBAAm) sobre el transporte de agua. Los autores encontraron, entre otras cosas, que los porcentajes de hidratación en el equilibrio del agua cambian según la masa molar del biopolímero y que los hidrogeles manifestaron un mecanismo de difusión del agua menos Fickiano, en el que la velocidad de penetración del agua hacia la matriz del hidrogel es menor que la relajación de las cadenas. El segundo artículo, por su parte, investiga un catalizador de Cu soportado sobre un material mesoporoso (MCM-41) en la isomerización del epóxido de α -pineno para la obtención de aldehído canfolénico. Para esto, se sintetizó y se caracterizó el catalizador mediante diferentes técnicas y también se evaluaron los efectos de distintas condiciones de reacción como la cantidad de catalizador, temperatura, tiempo de reacción y tipo de solvente. Los autores encontraron que la cantidad de catalizador, el tiempo de reacción y el tipo de solvente son los factores de mayor influencia en la conversión. Así mismo, establecieron las condiciones óptimas de selectividad y conversión de aldehído canfolénico a través del catalizador estudiado. El último artículo de la sección tuvo como objetivo diseñar un método de purificación del fibrinógeno gamma A/gamma prima ($\gamma A/\gamma'$) a partir de plasma humano. Se precipitó el fibrinógeno total con β -alanina y se purificó el fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ mediante una cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC). La presencia del fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ se confirmó mediante Western blot y se cuantificó por ELISA. Se concluye que este método de purificación resulta ser más eficiente comparado con otros procesos desarrollados anteriormente.

Por otro lado, en la sección de Química Aplicada y Analítica, contamos con dos artículos. El primero de ellos comparó el proceso de adsorción-desorción de diurón y ametrina en un suelo de Colombia, zona tropical, y uno de España, zona templada. Entre los resultados se incluye que el diurón se adsorbe fuertemente en el suelo de España en comparación con el suelo de Colombia, mientras que con ametrina se evidenció el comportamiento contrario, debido a que su adsorción-desorción está influenciada por el pH de cada suelo. El segundo artículo, por su parte, comparó los distintos productos de oxidación de colesterol (COPs) obtenidos por fase sólida (SPE) y cromatografía líquida en fase normal y reversa, con el objetivo de reducir las transformaciones de COPs a través de la optimización de los procesos de limpieza. Los autores encontraron que las condiciones óptimas de limpieza son: limpieza SPE con cartuchos C_{18} ; ajuste del pH (entre 4 y 6) y optimización del volumen de elución de metanol (10 mL). A través de estos parámetros se evitaron las transformaciones de COPs en el proceso y se requirieron menos pasos en su elaboración.

Por último, en la sección de Fisicoquímica e Inorgánica, contamos con un artículo. En este se estudió la influencia de algunos parámetros reológicos como viscosidad aparente, esfuerzo cortante inicial, índice de consistencia e índice de flujo de hidromezclas lateríticas, en los parámetros energéticos que permiten el funcionamiento del sistema de bombeo en la obtención de sulfuro de níquel: cargas, pérdidas hidráulicas, potencia y eficiencia. Los autores concluyeron que un modelo matemático que reúna tanto los parámetros reológicos como los parámetros energéticos del sistema de bombeo ayuda a optimizar y hacer más eficiente la operación con un incremento promedio en la producción.

El número cuenta, entonces, con información novedosa que podría contribuir a las problemáticas ambientales, de producción y metodológicas en distintos campos. Finalmente, el equipo editorial de la Revista Colombiana de Química agradece a los autores y evaluadores nacionales e internacionales que ayudaron a construir esta edición.

Carlos-Eduardo Narváez-Cuenca
Director, Revista Colombiana de Química

The third issue of volume 47 of the year 2018 of Revista Colombiana de Química has the participation of different national and international authors. The contributions come from national authors from the cities of Tunja, Santa Marta, Montería, Medellín, Bogotá, Pasto, and Cali. The international authors come from Mérida, Sucre and Caracas (Venezuela), Genoa (Italy), and Moa and Havana (Cuba). The content of the number is presented below.

In the section of Organic and Biochemistry three articles are included. In the first one some semi-interpenetrated hydrogels (semi-IPN) formed from acrilamida (PAAm) and the biopolymer poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) [P(HB-co-HV)] were synthesized with the aim of evaluating the effect of both composition of PAAm/biopolymer and the percentage of cross-linking reagent (MBAAm) on water transport. The authors found that the hydration percentages in the water balance change according to the molar mass of the biopolymer and that the hydrogels manifested a less Fickian water diffusion mechanism, in which the rate of water penetration into the hydrogel's matrix is smaller than the chains relaxation. The second article investigates a copper catalyst supported on a mesoporous material (MCM-41) in the isomerization of α -pinene epoxide to obtain campholenic aldehyde. For this purpose, the catalyst was synthesized and characterized by different techniques and the effects of different reaction conditions, including amount of catalyst, temperature, reaction time, and type of solvent. The authors found that the amount of catalyst, reaction time, and type of solvent are the most influential factors in the conversion. Likewise, they established the optimum conditions of selectivity and conversion of campholenic aldehyde through the studied catalyst. The last article of the section aimed to design a fibrinogen gamma A/gamma prima ($\gamma A/\gamma'$) purification method from human plasma. Total fibrinogen was precipitated with β -alanine and $\gamma A/\gamma'$ fibrinogen was purified by fast protein liquid chromatography (FPLC). The presence of $\gamma A/\gamma'$ fibrinogen was confirmed by Western blot and quantified by ELISA. It is concluded that this purification method turns out to be more efficient compared to other previously reported.

Furthermore, in the section of Applied and Analytical Chemistry, we have two articles. The first of them compared the adsorption-desorption process of diuron and ametryn in a soil in Colombia, a tropical zone, and one in Spain, a temperate zone. Among the results, it was found that diuron is strongly adsorbed in the Spanish soil in comparison with the Colombian one, while with ametryn the opposite behavior was evidenced. This behavior was hypothesized to be related to the adsorption-desorption process which is influenced by the pH of each soil. The second article, meanwhile, compared different cholesterol oxidation products (COPs) obtained by solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography in normal and reverse phase, with the aim of reducing the COPs transformations through the optimization of the cleaning processes. The authors found that the optimal cleaning conditions are: SPE cleaning with C_{18} cartridges; pH adjustment (between 4 and 6); and elution volume (Methanol, 10 mL). Through these parameters, the COPs transformations in the process were avoided and fewer steps were required in their elaboration.

Finally, in the Physical Chemistry and Inorganic section, we have an article. In this one, the influence of some rheological parameters such as apparent viscosity, initial shear stress, consistency index, and flow index of lateritic hydromixes was studied in the energy parameters that allow the operation of the pumping system in the production of nickel sulphide: charges, hydraulic losses, power, and efficiency. The authors concluded that a mathematical model that combines both the rheological parameters and the energy parameters of the pumping system helps to optimize and make the operation more efficient with an average increase in production.

The number counts, then, with new information that could contribute to the environmental, production and methodological problems in different fields. In addition, the editorial team of Revista Colombiana de Química thanks the authors and national and international reviewers who helped to build this issue.

Carlos-Eduardo Narváez-Cuenca
Director, Revista Colombiana de Química



Estudio de la capacidad de absorción en hidrogeles semi-interpenetrados de poliacrilamida/poli(hidroxibutirato-co-hidroxicvalirato)

Resumen

Se sintetizaron hidrogeles semi-interpenetrados (semi-IPN) obtenidos a partir de acrilamida (AAm) y el biopolímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxicvalirato) (P(HB-co-HV)) de diferente masa molar (Mv). El análisis de la estructura química de los materiales se realizó mediante espectroscopia FT-IR. Los resultados sugirieron la incorporación del P(HB-co-HV) dentro de la red entrecruzada de la poliacrilamida (PAAm), lo que indicó que el hidrogel semi-IPN fue sintetizado. Adicionalmente, se analizaron muestras del gel seco semi-IPN a través de calorimetría diferencial de barrido. Se siguió gravimétricamente el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles en agua y se analizó el efecto de la composición porcentual y del porcentaje de reactivo entrecruzante (N,N'-metileno-bisacrilamida, MBAAM) sobre los mecanismos de transporte de agua. Los resultados obtenidos indicaron que los hidrogeles semi-IPN se hinchan menos que el hidrogel de PAAm pura, lo que se atribuyó al carácter hidrófobo del biopolímero incorporado dentro de la red entrecruzada del material. Se calculó el exponente de difusión de los hidrogeles (n) y en todos los casos se obtuvo que $n < 0,50$. Por tanto, el proceso de difusión es *menos Fickiano*, lo que significa que la rapidez de penetración del agua es mucho menor que la velocidad de relajación de las cadenas de polímero.

Palabras clave: redes semi-interpenetradas; hidrólisis; biopolímero; cinética.

Study of the absorption capacity in semi-interpenetrating hydrogels of polyacrylamide/poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)

Abstract

Semi-interpenetrated hydrogels (semi-IPN) obtained from acrylamide (AAm) and the biopolymer poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (P(HB-co-HV)) of different molar mass (Mv) were synthesized. Chemical structure of the synthesized materials was analyzed by using FT-IR spectroscopy. The results suggested the incorporation of P(HB-co-HV) within the cross-linked network of the Polyacrylamide (PAAm), which indicated that the semi-IPN hydrogel was synthesized. To confirm this result, semi-IPN dry gel samples were analyzed by differential scanning calorimetry. The swelling behavior of the hydrogels in water was followed gravimetrically and the effect of the percentage composition and percentage of crosslinking reagent (N,N'-methylenebisacrylamide, MBAAM) on the water transport mechanisms was analyzed. Results indicated that the semi-IPN hydrogels swell less than the PAAm hydrogel alone, which was attributed to the hydrophobic nature of the biopolymer incorporated within the crosslinked network of the material. Additionally, the diffusion exponent of the hydrogels (n) was calculated and in all cases, the obtained result was $n < 0.50$. This fact shows that the diffusion process is less Fickian, which means that the speed of water penetration is lower than the speed of relaxation of the polymer chain.

Keywords: interpenetrated networks; hydrolysis; biopolymer; kinetic.

Estudo da capacidade de absorção em hidrogeis semi-interpenetrados de poliacrilamida/poli(hidroxibutirato-co-hidroxicvalerato)

Resumo

Foram sintetizados hidrogeis semi-interpenetrados (semi-IPN) obtidos a partir de acrilamida (AAm) e biopolímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxicvalerato) (P(HB-co-HV)) de diferente peso molecular (Mv). Os resultados da análise da estrutura química do material foram feitos por espectroscopia FT-IR. Os resultados sugerem a adição do P(HB-co-HV) no interior da rede de ligações cruzadas de poliacrilamida (PAAm), isto indica que o hidrogel semi-IPN foi sintetizado. Este resultado foi confirmado, por meio da análise de amostras de calorimetria diferencial de varredura do gel seco semi-IPN. O comportamento do inchamento dos hidrogeis na água foi seguido pela gravimetria e foi analisado o efeito da composição porcentual e a percentagem de reagente de ligação cruzada (N,N'-metileno-bisacrilamida, MBAAM) sobre o mecanismo de transporte de água. Os resultados indicam que os hidrogeis semi-IPN incham-se menos do que o hidrogel da PAAm pura. Este comportamento foi atribuído ao carácter hidrofóbico incorporado no material do biopolímero incorporado dentro da rede de ligações cruzadas. O expoente de difusão dos hidrogeis (n) foi calculado, e em todos os casos foi obtido que $n < 0,50$. Então o processo de difusão é *menos Fickiano*, o que significa que a velocidade de penetração da água é muito mais baixa do que a taxa de relaxamento da cadeia de polímero.

Palavras-chave: redes semi-interpenetradas; hidrólise; biopolímero; cinética.



Introducción

Los hidrogeles son materiales poliméricos reticulados capaces de absorber y retener grandes cantidades de agua y fluidos biológicos [1, 2]. Las características físicas y químicas de estos materiales son importantes, ya que determinan la posible aplicación de los mismos. Desde el punto de vista físico, la propiedad más importante que presentan los hidrogeles es su grado de hinchamiento que mide su capacidad de absorción y controla gran número de sus propiedades mecánicas superficiales [3, 4].

Normalmente, el comportamiento de los hidrogeles depende de las condiciones externas a las que están expuestos, por lo que pueden responder a diferentes estímulos externos tales como: cambio de pH, composición del solvente, fuerza iónica, luz, temperatura, antígeno, entre otros [5, 6]. La biocompatibilidad es otra de sus características más frecuentes e importantes [7], lo que permite que se puedan utilizar en el campo de la biomedicina, farmacia, biotecnología, agricultura, industrias de alimentos, en la liberación controlada de fármacos, entre otros [1, 8, 9].

En este sentido, los hidrogeles son prometedores en diferentes áreas, como por ejemplo la descontaminación de aguas residuales debido a su capacidad de absorber iones [9-11]. Para estudiar su capacidad de remediación en efluentes industriales, Rojas *et al.* [11] sintetizaron un hidrogel de poli(acrilamida-co-ácido acrílico) lo cual dio buenos resultados en la absorción de iones Cu^{2+} y Mg^{2+} .

Estos polímeros también son aplicables en la agricultura para aumentar la capacidad de retención de agua en el suelo, favoreciendo el desarrollo de las plantas [12]. Por ejemplo, Rojas *et al.* [13] usaron un hidrogel de poli(acrilamida-co-ácido maleico) con el propósito de analizar su aplicación en la germinación de semillas de tomate en diferentes tipos de suelos con características áridas. El hidrogel mejoró el suministro de agua a la planta y, por ende, incrementó la germinación en comparación con el suelo que no contenía el hidrogel.

Cuando estos materiales se sintetizan a escala nanométrica, se conocen como nanohidrogeles [8, 14]. Gracias a su biocompatibilidad, la cual se atribuye a su similitud fisicoquímica con la matriz extracelular, estos nuevos materiales son muy prometedores en la biomedicina como dispositivos de liberación controlada de fármacos, particularmente cuando son sensibles al pH, como por ejemplo aquellos que contienen en su estructura poli(etilenglicol), polisacáridos o poli(aspartamidas) [15]. Otra ventaja de la aplicación de estos polímeros es su estructura altamente porosa que permite la incorporación de algún fármaco específico (antibiótico, cicatrizante, analgésico) u otra sustancia bioactiva (fertilizante, pesticida) y la posterior liberación de la dosis mínima necesaria [16].

También existen hidrogeles obtenidos a partir de las denominadas redes interpenetradas (IPNs, interpenetrating polymer networks). Estos se definen como la combinación de dos o más polímeros reticulados que son sintetizados de forma simultánea en el mismo medio de reacción [17]. Además han sido descritos como redes poliméricas que se mantienen unidas por los enredos permanentes que poseen [18]. Estas redes IPN son sintetizadas de distintas formas, entre las que se encuentran los semi-IPN o pseudo-IPN constituidos por una mezcla de polímeros en el que uno de ellos es entrecruzado en presencia de un polímero lineal. Este último es incorporado durante la síntesis del hidrogel, de manera que, durante la polimerización por adición, el polímero queda ocluido dentro de la red polimérica tridimensional.

Se ha reportado que la estructura de los IPN y de los semi-IPN suministra resistencia adicional a los hidrogeles y nuevas propiedades de absorción [19-21].

En comparación con las mezclas poliméricas, constituidas por los componentes del hidrogel, estos materiales poseen propiedades mejoradas, como por ejemplo, la unión en un mismo material de polímeros que tengan propiedades diferentes: uno de los componentes puede poseer sensibilidad al pH, mientras que el otro puede ser sensible a los cambios de temperatura [22]. Se suelen utilizar dos tipos de clasificaciones para describir a los IPN: por vía química y por vía estructural [17].

Ahora bien, los plásticos biodegradables ideales son definidos como aquellos materiales que se degradan completamente en CO_2 , H_2O y subproductos no tóxicos bajo la acción de los microorganismos [23]. Dentro de este tipo de materiales se encuentran los poliésteres alifáticos de origen bacteriano de tipo poli(hidroxicanoatos) que pueden ser biosintetizados, como por ejemplo el poli(3-hidroxiбутirato) (PHB) y el P(HB-co-HV) [24-26]. El desarrollo de hidrogeles que contengan este tipo de biopolímeros permite generar materiales biodegradables, sobre todo en el área de la higiene personal, como absorbentes de fluidos corporales, por ejemplo, en compresas para mujeres y en pañales para bebés y personas adultas afectadas de problemas de incontinencia urinaria.

En un trabajo previo, reportamos la síntesis y caracterización de hidrogeles semi-IPN a partir de AAm y P(HB-co-HV), evaluando sus propiedades de absorción, morfológicas y térmicas [27]. Sin embargo, en dicho trabajo no se evaluó el mecanismo de difusión del agua dentro de la red polimérica del material. Por lo anterior, en este trabajo se llevó a cabo la síntesis de varios hidrogeles semi-IPN de PAAm y del biopolímero P(HB-co-HV) de diferente masa molar, con el objetivo de analizar el efecto de la composición porcentual PAAm/biopolímero y del porcentaje de reactivo entrecruzante (MBAAm) sobre los mecanismos de transporte de agua. Además, se analizó el efecto de la masa molar del P(HB-co-HV) sobre las propiedades de hinchamiento en agua de los hidrogeles sintetizados.

Materiales y métodos

Reactivos

Los reactivos usados fueron: AAm (Sigma Aldrich, USA; 97%); MBAAm (Honeywell Riedel-de-HaënTM, Alemania; 98%); ácido acético glacial (Sigma-Aldrich, USA) y azobisisobutironitrilo (AIBN) (Laboratory Reagents, USA; 98%).

El P(HB-co-HV) nativo tiene las siguientes características: Copersucar; composición molar: HB 93,2% y HV 5,5%; $M_v = 170000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Hidrólisis del P(HB-co-HV)

Con el fin de obtener un poliéster de masa molar más baja, el P(HB-co-HV) nativo fue sometido a hidrólisis mediante el siguiente procedimiento: en un balón de tres bocas se introdujeron 2 g de P(HB-co-HV) y 100 mL de ácido acético concentrado. Luego, la mezcla de reacción fue sometida a reflujo a una temperatura de 60°C durante 20 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción y, seguidamente, se agregaron 300 mL de agua. Se formó un precipitado que se aisló mediante filtrado a través de un embudo de Büchner. El producto se purificó disolviéndolo en cloroformo y, posteriormente, se precipitó con metanol. Se colectó nuevamente en un embudo Büchner y, finalmente, fue lavado con metanol.

Síntesis de los hidrogeles semi-IPN

La síntesis se llevó a cabo mediante el procedimiento previamente reportado por González *et al.* [23]. Los hidrogeles fueron sintetizados usando diferentes proporciones en peso PAAm/P(HB-co-HV): 100/0; 90/10 y 80/20. La MBAAm fue usada como agente entrecruzante en las proporciones en peso de 1 y 2 %. La reacción se llevó a cabo en agua y se inició vía radical libre usando AIBN como iniciador a 60 °C.

Caracterización

Resonancia magnética nuclear (RMN-¹H)

Los espectros fueron obtenidos usando cloroformo deuterado como solvente en un espectrómetro de RMN Bruker AVANCE II 400 MHz y fueron referenciados usando los protones residuales en el solvente deuterado ($\delta = 7,25$ ppm).

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros FT-IR fueron obtenidos empleando pastillas de KBr a través de un espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum 2000. Todos los espectros fueron adquiridos después de 32 barridos usando una resolución espectral de ± 4 cm⁻¹.

Calorimetría de barrido diferencial (CDB)

Estos análisis se realizaron con un calorímetro Perkin-Elmer DSC-7, con alrededor de 10 mg de muestra y con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en un intervalo de temperatura entre -40 y 200 °C, bajo atmósfera de nitrógeno con un flujo de 30 mL/min, calibrado con indio.

Viscosimetría

Las medidas de viscosidad para obtener la masa molar de los biopolímeros se realizaron usando la técnica descrita en la bibliografía [28, 29]. La viscosidad intrínseca $[\eta]$ del P(HB-co-HV) fue obtenida en CHCl₃ a 30 °C y la masa molar viscosidad promedio (Mv) fue obtenida usando la ecuación (1) propuesta por Hermida *et al.* [30].

$$Mv = 1,18 \times 10^{-4} [\eta]^{0,78} \quad (1)$$

Hinchamiento

El grado de hidratación (hinchamiento, H_p) se determinó usando el método gravimétrico [26]. Con este fin, una película o pastilla de xerogel de aproximadamente 0,1 g fue sumergida en agua destilada a temperatura ambiente. A intervalos de tiempo previamente establecidos, se extrajo el hidrogel y se determinó su masa. Este procedimiento se repitió varias veces hasta que los hidrogeles alcanzaron el equilibrio fisicoquímico, es decir, donde no se observó variación en su masa.

Estudio de la morfología

El estudio de la morfología de los xerogeles se realizó a través de imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de la superficie liofilizada de muestras hinchadas. Las muestras fueron sumergidas en agua destilada hasta que alcanzaron el hinchamiento en el equilibrio, se enfriaron en nitrógeno líquido y, posteriormente, fueron liofilizadas durante 24 h usando un aparato Labconco FreeZone 2.5 durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las muestras se recubrieron con una fina capa de oro para volverlas conductoras, mediante un recubridor iónico marca SPI modelo 11430E-AE.

Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio electrónico de barrido (HITACHI S-2500) operando a 12 kV con una magnificación de 500 veces.

Partiendo de las micrografías MEB obtenidas y utilizando el software TpsDig2 [31], se dividieron las micrografías en 4 cuadrantes y se pudieron realizar medidas de los diámetros internos de cada poro (4 medidas/poro) en distintas micrografías de la misma muestra. El tamaño de poro reportado es un promedio de las cuatro medidas.

Resultados y discusión

Hidrólisis del biopolímero

Antes del proceso de síntesis de los diferentes hidrogeles, el biopolímero fue sometido a una reacción de hidrólisis en medio ácido. Esto se llevó a cabo, dado que uno de los objetivos de esta investigación era estudiar el efecto de la masa molar del biopolímero en las propiedades de hinchamiento del hidrogel. La composición molar de las unidades comonoméricas en el P(HB-co-HV) (nativo e hidrolizado) se determinó mediante espectroscopia ¹H-RMN, las composiciones molares que se obtuvieron se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Proporciones de los comonomeros en el biopolímero nativo e hidrolizado.

Comonomeros	P(HB-co-HV) nativo (%)	P(HB-co-HV) hidrolizado (%)
Butirato	92,34	94,63
Valerato	7,66	5,28

P(HB-co-HV)=poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), nativo=muestra comercial (Copersucar)

Se puede notar que las composiciones molares de ambas unidades comonoméricas no tuvieron una variación significativa al hidrolizar el biopolímero nativo, es decir que su estructura cambia muy poco.

Por otra parte, tomando en cuenta que el proceso de hidrólisis debería provocar una disminución en la masa molar del biopolímero, se procedió a medir la masa molar mediante la técnica de viscosimetría del P(HB-co-HV) nativo y de aquel que fue sometido al proceso de hidrólisis [28-30]. Los valores de Mv obtenidos para el biopolímero nativo y el hidrolizado fueron 66095 g·mol⁻¹ y 22135 g·mol⁻¹, respectivamente. Este resultado indica que el Mv del biopolímero hidrolizado disminuyó tres veces, aproximadamente, respecto al del biopolímero nativo y, por tanto, el proceso de hidrólisis fue efectivo.

Síntesis y caracterización de los hidrogeles semi-IPN

Los dos biopolímeros (nativo e hidrolizado) fueron usados para sintetizar los hidrogeles semi-IPN. En la Figura 1 se muestra, a manera de ejemplo, uno de los hidrogeles semi-IPN preparados, antes y después del proceso de purificación.

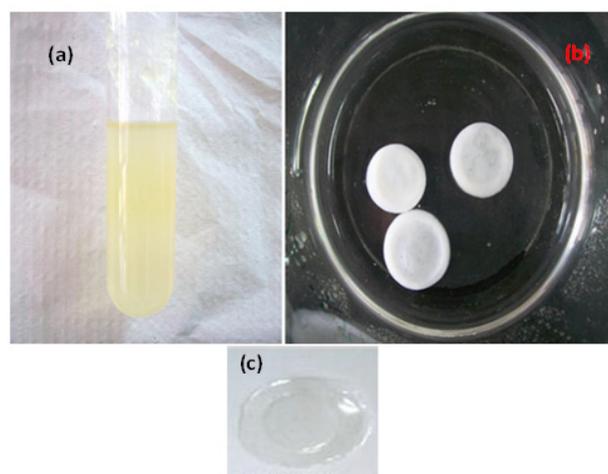


Figura 1. Hidrogeles semi-IPN (PAAm/ P(HB-co-HV): 80/20): (a) sin purificar; (b) purificado; (c) PAAm pura. Relación PAAm / P(HB-co-HV) de 100/0 con un 1% de MBBAm.

El color amarillo del material no purificado (Figura 1a) se debe a restos de los reactivos de partida que no reaccionaron, los cuales son extraídos de la matriz polimérica durante la purificación del hidrogel. Por otra parte, teniendo en cuenta que el hidrogel de PAAm pura en su estado de xerogel es transparente, el color blanco observado en el hidrogel semi-IPN podría deberse a la incorporación del biopolímero, el cual es un polvo de color blanco.

Los diferentes hidrogeles obtenidos en su estado seco (xerogel) fueron caracterizados mediante espectroscopia FT-IR. La Figura 2 muestra de forma comparativa los espectros FT-IR del biopolímero P(HB-co-HV) hidrolizado, de uno de los xerogeles semi-IPN sintetizado con el biopolímero hidrolizado y del xerogel de PAAm pura. Los espectros de los demás geles semi-IPN sintetizados fueron idénticos al mostrado en la Figura 2-(b).

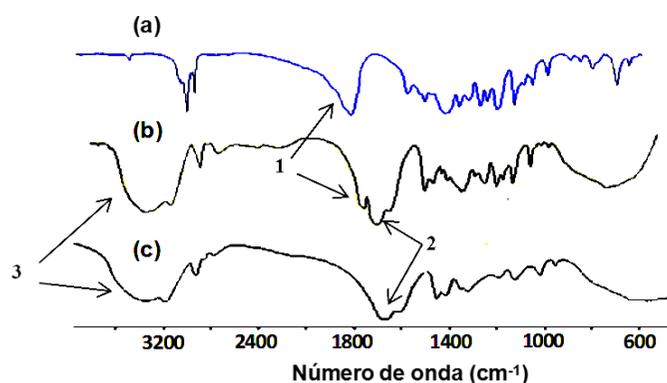


Figura 2. Espectros FTIR de: a) P(HB-co-HV) hidrolizado, b) xerogel Semi-IPN y c) xerogel de PAAm.

Lo más importante a resaltar de la Figura 2 es que, en el espectro correspondiente a la red semi-IPN (b), es posible observar a 1726 cm^{-1} la señal correspondiente a la vibración de tensión del grupo carbonilo (C=O) del biopolímero (banda 1, en los espectros (a) y (b)). Esta señal no se observa en el espectro del xerogel de PAAm (c).

Este resultado indica la presencia del biopolímero en el interior del hidrogel. En el espectro del material semi-IPN (b) también se pueden notar las señales características del xerogel de PAAm: bandas de estiramiento de los grupos N-H entre 3200 y 3400 cm^{-1} (banda 3, en espectros (b) y (c)) e, igualmente, las vibraciones de estiramiento de grupo C=O en 1640 - 1650 cm^{-1} (banda 2, en espectros (b) y (c)).

Por otra parte, teniendo en cuenta que la PAAm es un material amorfo [32], sobre todo de manera entrecruzada, mientras que el biopolímero P(HB-co-HV) es un material semicristalino [33], los productos obtenidos fueron analizados mediante CDB. El comportamiento observado en los hidrogeles semi-IPN sintetizados fue similar al que se muestra en la Figura 3. Allí se presentan, de forma comparativa, los barridos del segundo calentamiento realizados al P(HB-co-HV) hidrolizado y al respectivo xerogel semi-IPN. Como se puede observar, tanto el biopolímero como el hidrogel semi-IPN muestran endotermas que aparecen en $162,5\text{ °C}$, atribuidas a la fusión de los cristales de P(HB-co-HV). Este valor es similar al reportado previamente para este copolímero por Qiu *et al.* [33]. Además, en ambos barridos se observa un hombro adyacente al pico de fusión (a 146 °C aproximadamente), atribuido a la fusión de cristales de menor tamaño generados por la interrupción de las secuencias cristalizables de PHB por parte de las unidades de valerato en el copolímero P(HB-co-HV) [34]. Este resultado confirma la incorporación efectiva del biopolímero a la red tridimensional del hidrogel de PAAm.

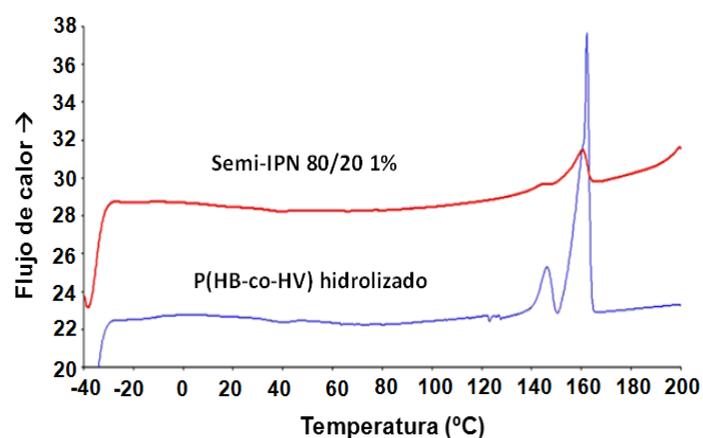


Figura 3. Barridos CDB del 2^{do} calentamiento para el P(HB-co-HV) hidrolizado y el xerogel semi-IPN de PAAm con P(HB-co-HV) hidrolizado (% p/p (PAAm/biopolímero): 80/20, usando 1% de agente entrecruzante).

Como se puede notar, la absorción de agua aumenta con el tiempo hasta alcanzar los porcentajes de hidratación en el equilibrio ($H_{\text{pmáx}}$). Estos valores son mostrados en la Tabla 2.

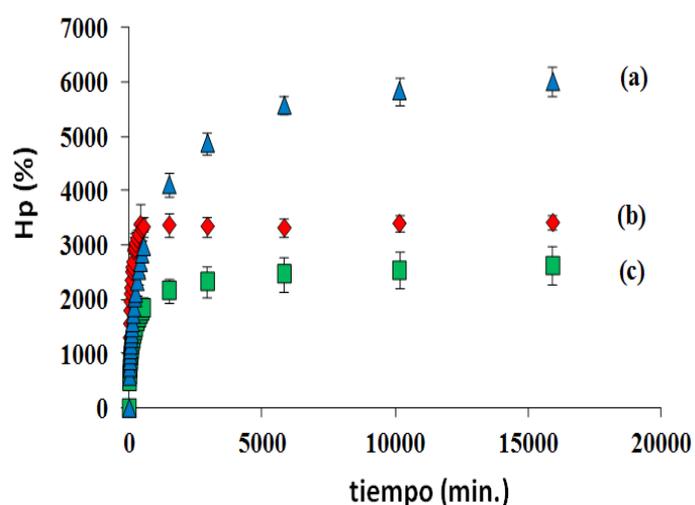
Con los datos obtenidos en la determinación del hinchamiento (H_p) de los hidrogeles, se desarrollaron las isotermas de hinchamiento para cada hidrogel sintetizado [26]. El comportamiento observado en todos los casos fue similar al que se muestra en la Figura 4.

Es posible observar que, debido a que la hidrólisis del P(HB-co-HV) provoca una disminución en el tamaño de las cadenas macromoleculares del biopolímero, se originó un incremento de 40% del H_p del hidrogel semi-PN obtenido con el biopolímero hidrolizado, respecto al obtenido con el biopolímero nativo. Este aumento se debe a que las cadenas al ser más pequeñas originan una mayor cantidad de grupos finales hidrófilos en el biopolímero.

Tabla 2. $H_{p_{\max}}$, coeficiente de difusión y constante de velocidad de hinchamiento de los hidrogeles semi-IPN con diferente composición (proporciones en peso) y agente entrecruzante.

PAAm/biopolímero (% p/p MBAAm)	100/0 (1%)	90/10 (1%)	80/20 ^(a) (1%)	80/20 ^(b) (1%)	100/0 (2%)	90/10 (2%)	80/20 (2%)
$H_{p_{\max}}$	6000	4683	3409	2620	4450	4061	1842
n	0,41	0,38	0,35	0,40	0,45	0,44	0,43
$k_h \times 10^7$	6,62	13,4	26,4	90,9	2,44	4,62	29,6

(a) Hidrogel sintetizado con el P(HB-co-HV) nativo; (b) hidrogel sintetizado con el P(HB-co-HV) hidrolizado; n : coeficiente de difusión; k_h es la constante de velocidad de hinchamiento.


Figura 4. Isotermas de hinchamiento para los hidrogeles sintetizados: (a) PAAm pura, (b) semi-IPN con el P(HB-co-HV) hidrolizado y (c) semi-IPN con el P(HB-co-HV) nativo; ambos semi-IPN en proporciones en peso 80/20 de PAAm/ P(HB-co-HV) sintetizados usando 1% de agente entrecruzante. La barra fina corresponde a la desviación estándar de la muestra.

Estudio cinético

El hinchamiento de los hidrogeles implica movimientos segmentales de gran escala, que generan una separación entre las cadenas de los hidrogeles que se va incrementando cada vez más con el hinchamiento. En estos sistemas, a medida que se difunde el solvente dentro del hidrogel, la respuesta del hidrogel no es inmediata [35-37], de manera que la penetración de las moléculas de agua dentro de las redes de un hidrogel es una función de la estructura de la red.

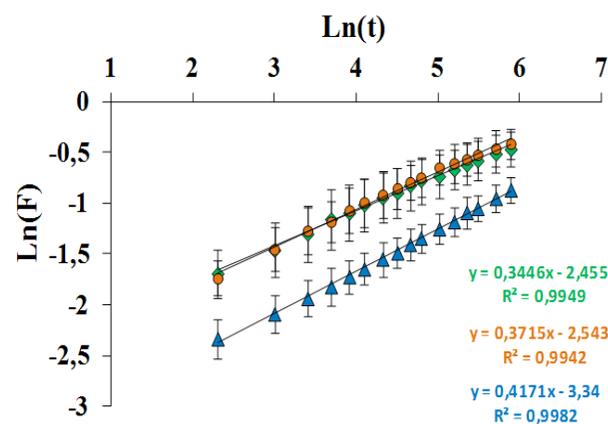
En una red semi-IPN, en la que uno de sus componentes es un material hidrófobo, los espacios entre las cadenas del hidrogel disminuyen y la red no puede ser expandida ni mantener una gran cantidad de agua.

La cinética de hinchamiento de los hidrogeles se estudió principalmente desde el punto de vista de difusión controlada (Fickiana), relajación controlada (no-Fickiana) y del modelo experimental de Schott. Se analizó el efecto de la composición porcentual y del porcentaje de reactivo entrecruzante (MBAAm) sobre los parámetros cinéticos del hinchamiento de los hidrogeles sintetizados.

La primera etapa del hinchamiento fue acelerada, tomó el 60% del tiempo antes de alcanzar $H_{p_{\max}}$ y estuvo gobernada por una cinética de orden cero [38]. Para esta etapa de hinchamiento se construyeron gráficos como los que se muestran en la Figura 5 a través de la ecuación (2).

$$F = \frac{M_t}{M_0} = kt^n \quad (2)$$

Donde: M_t y M_0 son las masas de la muestra de hidrogel hinchado en el tiempo t y de la misma muestra en estado seco (xerogel), respectivamente; t es el tiempo; k es una constante relacionada con el sistema de red y el medio de hinchamiento y n es el coeficiente de difusión que rige el modo de transporte del agua.


Figura 5. Difusión de Fick para los hidrogeles semi-IPN con distintas proporciones en peso PAAm/P(HB-co-HV): (▲)100/0, (●)90/10 y (◆)80/20, sintetizados usando 1% p/p de agente entrecruzante. La barra fina corresponde a la desviación estándar de la muestra.

La pendiente del gráfico corresponde al coeficiente de difusión (n) el cual proporciona el tipo de mecanismo de transporte del agua. Un valor de $n = 0,50$ indica un proceso de difusión Fickiana ideal. Esto quiere decir que la velocidad de difusión del solvente (R_{dif}) es mucho más lenta que la relajación de los cadenas poliméricas (R_{relaj}) (por lo tanto $R_{\text{dif}} \ll R_{\text{relaj}}$).

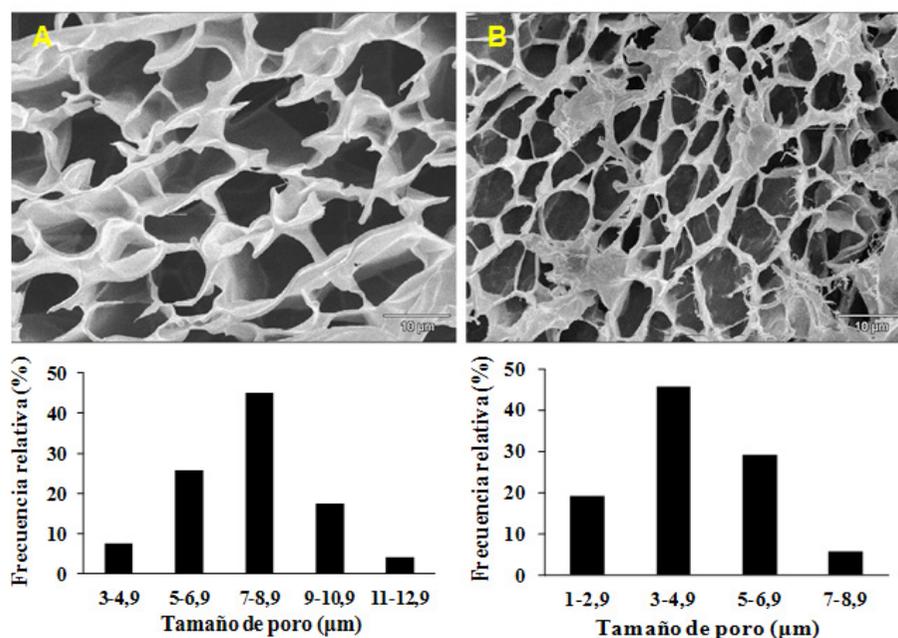


Figura 6. Micrografías MEB de hidrogeles de (A) poliacrilamida (PAAm) y (B) PAAm/P(HB-co-HV) 80/20 (proporción en peso), ambos con 1% *p/p* de agente entrecruzante.

Por el contrario, si se cumple que $1,00 > n > 0,50$, el tipo de transporte es anómalo, es decir, la velocidad de difusión del solvente es proporcional a la relajación de las cadenas poliméricas ($R_{dif.} \sim R_{relaj.}$). En la situación en que $n = 1,00$, el mecanismo de transporte es conocido como caso II, en el cual la velocidad de difusión del solvente es mayor que la relajación de las cadenas poliméricas ($R_{dif.} \gg R_{relaj.}$) [39].

Los valores del coeficiente de difusión (n), obtenidos a partir de las pendientes de las rectas, se presentan en la Tabla 2. En todos los casos se dio $n < 0,50$, lo cual indica que la velocidad de penetración del agua hacia la matriz polimérica del hidrogel es mucho menor que la relajación de las cadenas. En este caso, diversos autores consideran que la difusión sigue siendo fickiana o también se le denomina *menos fickiana* [40-42].

Es importante destacar que n , determinado para el hidrogel semi-IPN 80/20 y sintetizado con el P(HB-co-HV) hidrolizado, fue de 0,4. Por tanto, independientemente del tipo de biopolímero usado para realizar la síntesis del hidrogel semi-IPN, el valor fue de $n < 0,5$. Lo anterior indica que la disminución de la masa molecular del P(HB-co-HV) no influyó en el mecanismo de transporte del agua hacia la matriz polimérica del hidrogel. Por otro lado, el coeficiente de difusión tampoco cambió al variar el porcentaje de entrecruzante de 1 a 2%.

Ahora bien, para conocer la constante de velocidad de hinchamiento (k_h) se empleó el modelo experimental de Schott, que es aplicable para la fase completa del hinchamiento y obedece a una cinética de segundo orden [43]. En este modelo se utilizó la ecuación de Robinson (3), la cual permitió la construcción de gráficos a partir de los que se pudo determinar k_h (ver Tabla 2).

$$\frac{t}{H_p} = A + Bt \quad (3)$$

Donde: H_p es hinchamiento del hidrogel en el tiempo t ; $B = 1/H_{p_{máx.}}$ es igual al inverso del hinchamiento máximo en el equilibrio; $A = 1/k_h H_p^2$ es el igual al recíproco de la velocidad de hinchamiento y k_h es la constante de velocidad de hinchamiento.

En los hidrogeles semi-IPN se halló que, al aumentar la composición del P(HB-co-HV), incrementó la constante de velocidad de hinchamiento, pero disminuyó el hinchamiento. Es de esperar este comportamiento en estos materiales ya que, en la caracterización de su morfología (Figura 6), se evidenció la formación de mayor número de poros por área en la estructura, facilitando la entrada del agua. No obstante, las interacciones repulsivas del P(HB-co-HV) con el agua (interacción hidrófoba) hacen que el hinchamiento disminuya.

Los histogramas de las micrografías reflejaron diferencias entre sí. Para los hidrogeles de PAAm el tamaño de poro está comprendido entre un intervalo de 3 y 13 μm , mientras que para los hidrogeles semi-IPN de PAAm/P(HB-co-HV), 80/20 el intervalo se encuentra entre 1 y 9 μm . Para este último se encontró un tamaño de mayor frecuencia alrededor de 4 μm .

Conclusiones

Se sintetizaron hidrogeles Semi-IPN formados a partir de la red de PAAm y del poliéster biodegradable P(HB-co-HV) de diferente masa molar, mediante polimerización en solución vía radicales libres. El contenido de agua en el equilibrio se vio influenciado por la masa molar: $H_{p_{máx.}}$ aumenta con la disminución en la masa molar del biopolímero.

Por otra parte, de acuerdo con los valores del coeficiente de difusión (n), todos los hidrogeles mostraron un mecanismo de difusión de las moléculas de agua dentro del hidrogel del tipo *menos Fickiano*, lo cual indica que la velocidad de penetración del agua hacia la matriz polimérica del hidrogel es mucho menor que la relajación de las cadenas.

El parámetro cinético de absorción (k_b) aumentó con la proporción de biopoliéster usado para realizar la síntesis y con la disminución de la masa molar del P(HB-co-HV). En relación con la morfología del hidrogel, esta se ve afectada por la incorporación del P(HB-co-HV), generando una mayor cantidad de poro por área en la matriz polimérica.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento recibido por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente (UDO) a través del proyecto C1-2-040400-1673-10 y del Consejo de Desarrollo Científico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHA) a través de los proyectos C-1744-11-08-A y C-1746-11-08-B.

Referencias

- [1] A. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 54, no. 1, pp. 3-12, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00239-3).
- [2] M. Byrne, K. Park and N. Peppas, "Molecular imprinting within hydrogels", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 54, no. 1, pp. 149-161, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00246-0).
- [3] I. Katime Amashta, O. Katime Trabanca and D. Katime Trabanca, *Los materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones*. Bilbao: Universidad del País Vasco. 2004, pp. 51-52.
- [4] Y. Ishikawa, K. Hiratsuka and T. Sasada, "Role of water in the lubrication of hydrogel", *Wear*, vol. 261, no. 5-6, pp. 500-504, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wear.2005.12.001>.
- [5] X. Jia, K. Wang, J. Wang, Y. Hu, L. Shen and J. Zhu, "Full-color photonic hydrogels for pH and ionic strength sensing", *European Polymer Journal*, vol. 83, pp. 60-66, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.08.006>.
- [6] T. Miyata, N. Asami and T. Urugami, "A reversibly antigen-responsive hydrogel", *Nature*, vol. 399, no. 6738, pp. 766-769, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1038/21619>.
- [7] E. Crispim, J. Piai, A. Fajardo, E. Ramos, T. Nakamura, C. Nakamura, A. Rubira and E. Muniz, "Hydrogels based on chemically modified poly(vinyl alcohol) (PVA-GMA) and PVA-GMA/chondroitin sulfate: Preparation and characterization", *Express Polymer Letters*, vol. 6, no. 5, pp. 383-395, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2012.41>.
- [8] N. Peppas, J. Hilt, A. Khademhosseini and R. Langer, "Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology", *Advanced Materials*, vol. 18, no. 11, pp. 1345-1360, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.200501612>.
- [9] B. Özkahraman, I. Acar and S. Emik, "Removal of cationic dyes from aqueous solutions with poly (N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels", *Polymer Bulletin*, vol. 66, no. 4, pp. 551-570, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00289-010-0371-1>.
- [10] G. Jing, L. Wang, H. Yu, W. Amer and L. Zhang, "Recent progress on study of hybrid hydrogels for water treatment", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 416, pp. 86-94, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.09.43>.
- [11] B. Rojas, M. Ramírez, J. Prin, C. Torres, L. Bejarano, H. Villarroel, L. Rojas, M. Murillo, and I. Katime. "Hidrogeles de acrilamida/ácido acrílico y de acrilamida/poli(ácido acrílico): estudio de su capacidad de remediación en efluentes industriales", *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, vol. 30, pp. 28-39, 2010.
- [12] K. Kazanskii and S. Dubrovskii, "Chemistry and physics of "agricultural" hydrogels". In *Polyelectrolytes Hydrogels Chromatographic Materials. Advances in Polymer Science*, vol 104. Springer, Berlin, Heidelberg pp. 97-133, 1992. DOI: https://doi.org/10.1007/3-540-55109-3_3.
- [13] B. Rojas, M. Ramírez, R. Aguilera, J. Prin, C. Torres. "Los hidrogeles poliméricos como potenciales reservorios de agua y su aplicación en la germinación de semillas de tomate en diferentes tipos de suelos", *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 7, pp. 199-210, 2006.
- [14] L. Guerrero-Ramírez, S. Nuño-Donlucas, L. Cesteros and I. Katime, "Smart copolymeric nanohydrogels: Synthesis, characterization and properties", *Materials Chemistry and Physics*, vol. 112, no. 3, pp. 1088-1092, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2008.07.023>.
- [15] Jagur-Grodzinski, "Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications", *Polymers for Advanced Technologies*, pp.27-47, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/pat.1504>.
- [16] T. Hoare and D. Kohane, "Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges", *Polymer*, vol. 49, no. 8, pp. 1993-2007, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.01.027>.
- [17] L. H. Sperling, "Interpenetrating Polymer Networks: An Overview", *Journal American Chemical Society*, vol. 239, pp. 3-38, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1021/ba-1994-0239.ch001>.
- [18] Y. Zhao, J. Kang and T. Tan, "Salt-, pH- and temperature-responsive semi-interpenetrating polymer network hydrogel based on poly(aspartic acid) and poly(acrylic acid)", *Polymer*, vol. 47, no. 22, pp. 7702-7710, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.08.056>.
- [19] N. Kayaman, E. Hamurcu, N. Uyanik and B. Baysal, "Interpenetrating hydrogel networks based on polyacrylamide and poly(itaconic acid): synthesis and characterization", *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 200, no. 1, pp. 231-238, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3935\(19990101\)200:1%3C231::AID-MACP231%3E3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3935(19990101)200:1%3C231::AID-MACP231%3E3.0.CO;2-#).
- [20] C. Liu, Y. Chen and J. Chen, "Synthesis and characteristics of pH-sensitive semi-interpenetrating polymer network hydrogels based on konjac glucomannan and poly(aspartic acid) for in vitro drug delivery", *Carbohydrate Polymers*, vol. 79, no. 3, pp. 500-506, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.024>.
- [21] S. Jin, M. Liu, F. Zhang, S. Chen and A. Niu, "Synthesis and characterization of pH-sensitivity semi-IPN hydrogel based on hydrogen bond between poly(N-vinylpyrrolidone) and poly(acrylic acid)", *Polymer*, vol. 47, no. 5, pp. 1526-1532, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.01.009>.
- [22] A.K Bajpai, S. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane, "Responsive polymers in controlled drug delivery", *Progress in Polymer Science*, vol. 33, pp. 1088-1118, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005>.
- [23] Y. Ikada and H. Tsuji, "Biodegradable polyesters for medical and ecological applications", *Macromolecular rapid communications*, vol. 21, pp. 117-132, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3927\(20000201\)21:3%3C117::AID-MARC117%3E3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3927(20000201)21:3%3C117::AID-MARC117%3E3.0.CO;2-X).
- [24] A. Steinbüchel and B. Fuchtenbusch, "Bacterial and other biological systems for polyester production", *Trends in Biotechnology*, vol. 16, no. 10, pp. 419-427, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01194-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01194-9).

- [25] R. Lenz and R. Marchessault, "Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology", *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 1, pp. 1-8, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm049700c>.
- [26] S. Valappil, S. Misra, A. Boccaccini and I. Roy, "Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates, an overview of animal testing and in vivo responses", *Expert Review of Medical Devices*, vol. 3, no. 6, pp. 853-868, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1586/17434440.3.6.853>.
- [27] N. González, J. Contreras, F. López-Carrasquero, A. El-Halah, C. Torres, J. Prin, J. Benítez, B. Rojas, "Estudio de la síntesis y caracterización de hidrogeles semi-IPN obtenidos a partir de poli(acrilamida) y el biopolímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)", *Interciencia*, vol. 38, pp. 430-436, 2013.
- [28] F. Billmeyer, *Ciencia de los polímeros*. Segunda edición, Barcelona: Reverté, 1975, pp. 85-91.
- [29] I. Katime, *Química física macromolecular*. Bilbao-España: Universidad del país Vasco, 1994, pp. 259-279.
- [30] É. Hermida, O. Yashchuk and S. Miyazaki, "Changes in the mechanical properties of compression moulded samples of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) degraded by *Streptomyces omiyaensis* SSM 5670", *Polymer Degradation and Stability*, vol. 94, no. 2, pp. 267-271, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2008.10.019>.
- [31] F. Rohlf, TPS Dig, digitize landmarks and outlines, version 2.0. Department of ecology and evolution, State University of New York at Stony Brook, 2004.
- [32] R. Zumaya, R. Cruz, J. Rivera, M. Chávez, A. Mendoza, R. Ramírez, and I. Katime, "Liberación de Ibuprofeno empleando hidrogeles de Poli(Carboximetil celulosa-co-acrilamida)", *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 10, no. 6, pp. 288-296, 2009.
- [33] Z. Qiu, T. Ikehara and T. Nishi, "Miscibility and crystallization behaviour of biodegradable blends of two aliphatic polyesters. Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(butylene succinate) blends", *Polymer*, vol. 44, no. 24, pp. 7519-7527, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2003.09.029>.
- [34] L. Gunaratne and R. Shanks, "Multiple melting behaviour of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using step-scan DSC", *European Polymer Journal*, vol. 41, no. 12, pp. 2980-2988, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.06.015>.
- [35] B. Bişik, "Swelling behavior of acrylamide-2-hydroxyethyl methacrylate hydrogels", *Turk J Chem*, vol. 24, pp. 147-156, 2000.
- [36] E. Karadağ, D. Saraydın and O. Güven, "Radiation Induced Superabsorbent Hydrogels. Acrylamide/Itaconic Acid Copolymers", *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 286, no. 1, pp. 34-42, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1002/1522-2720\(200101\)286:01:1-34::AID-MAME34.0.CO;2](https://doi.org/10.1002/1522-2720(200101)286:01:1-34::AID-MAME34.0.CO;2).
- [37] E. Karadağ and D. Saraydın, "Swelling of Superabsorbent Acrylamide/Sodium Acrylate Hydrogels Prepared Using Multifunctional Crosslinkers", *Turk J Chem*, vol. 26, pp. 863-875, 2002.
- [38] E. Karadağ, Ö. Bariş Üzümlü and D. Saraydın, "Water uptake in chemically crosslinked poly(acrylamide-co-crotonic acid) hydrogels", *Materials & Design*, vol. 26, no. 4, pp. 265-270, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2004.07.014>.
- [39] L. Masaro and X. Zhu, "Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids", *Progress in Polymer Science*, vol. 24, no. 5, pp. 731-775, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(99\)00016-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(99)00016-7).
- [40] A. Bajpai, J. Bajpai and S. Shukla, "Water sorption through a semi-interpenetrating polymer network (IPN) with hydrophilic and hydrophobic chains", *Reactive and Functional Polymers*, vol. 50, no. 1, pp. 9-21, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(01\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(01)00085-2).
- [41] A. Bajpai and A. Giri, "Swelling dynamics of a macromolecular hydrophilic network and evaluation of its potential for controlled release of agrochemicals", *Reactive and Functional Polymers*, vol. 53, no. 2-3, pp. 125-141, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(02\)00168-2](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(02)00168-2).
- [42] J. Wang, W. Wu and Z. Lin, "Kinetics and thermodynamics of the water sorption of 2-hydroxyethyl methacrylate/styrene copolymer hydrogels", *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 109, no. 5, pp. 3018-3023, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.28403>.
- [43] H. Schott, "Kinetics of swelling of polymers and their gels", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 81, no. 5, pp. 467-470, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.2600810516>.

Article citation:

N. González, A. El-Halah, J. M. Contreras & B. Rojas de Gascue. "Estudio de la capacidad de absorción en hidrogeles semi-interpenetrados de poli(acrilamida)/poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)" *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 47, no. 3, pp. 5-12, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v47n3.69280>.

Optimización de la síntesis de aldeído canfolénico a partir del epóxido de α -pineno con Cu/MCM-41

Resumen

Se sintetizó el catalizador Cu/MCM-41 mediante impregnación húmeda incipiente y se caracterizó por DRX, XPS, TPD-NH₃ y adsorción-desorción de N₂. Se evaluó el efecto de diferentes condiciones de reacción (temperatura, tiempo, tipo de solvente y cantidad de catalizador) en la isomerización del epóxido de α -pineno para la obtención de aldeído canfolénico con el catalizador Cu/MCM-41, que no había sido reportado previamente para este tipo de reacción. Se partió de un diseño experimental central compuesto mediante análisis de superficie de respuesta. Se encontró que la mejor selectividad fue de 85% (5 mg de catalizador; 70 °C; 0,5 h y el uso de acetato de etilo como solvente). Adicionalmente, se determinaron los principales factores y sus combinaciones que tenían mayor significancia en la síntesis del aldeído ajustado a un modelo polinomial de segundo grado. Se encontró que los factores que tienen mayor influencia en la conversión son la cantidad de catalizador, tiempo de reacción, el tipo de solvente y el factor combinado entre la cantidad de catalizador y el tipo de solvente. En el caso de la selectividad hacia el producto deseado no se encontró ningún factor significativo.

Palabras clave: diseño de experimentos; isomerización; aldeído canfolénico; epóxido.

Optimization of the synthesis of campholenic aldehyde from α -pinene epoxide with Cu/MCM-41

Abstract

The Cu/MCM-41 catalyst was synthesized by incipient wet impregnation and characterized by XRD, XPS, TPD-NH₃, and N₂ adsorption-desorption. The effect of different reaction conditions (temperature, time, type of solvent, and amount of catalyst) on the isomerization reaction of α -pinene epoxide was evaluated to obtain camphoric aldehyde with the Cu/MCM-41 catalyst, which had not been previously reported for this kind of reaction. The experiment was based on a central composite experimental design composed by response surface analysis. The best campholenic aldehyde selectivity was found to be 85% (5 mg of catalyst, 70 °C, 0.5 h and the use of ethyl acetate as a solvent). Furthermore, the main factors and their combinations that had the greatest significance in the synthesis were adjusted to a polynomial second order model. The factors with the main influence on conversion were the catalyst amount, reaction time, solvent type, and the combined factor between catalyst amount and the solvent type. In the case of campholenic aldehyde selectivity no significant factor was found.

Keywords: experiment design; isomerization; campholenic aldehyde; epoxide.

Optimização da síntese de aldeído camfolênico desde epóxido de α -pineno com Cu/MCM-41

Resumo

O catalizador Cu/MCM-41, sintetizado pelo método de impregnação a umidade incipiente, foi caracterizado por DRX, XPS, TPD-NH₃ e adsorção-desorção de N₂ e testado na reação de isomerização do epóxido de α -pineno. Diferentes condições de reação foram exploradas a partir de um desenho experimental central composto. A melhor seletividade de aldeído camfolênico encontrada foi de 85% (5 mg de catalizador; 70 °C; 0,5 h e acetato de etilo como solvente). Além disso, os principais fatores e as combinações entre eles que tiveram influência na síntese do aldeído camfolênico foram ajustados a um modelo polinomial de segunda ordem. Verificou-se que os fatores com a principal influência na conversão foram a quantidade de catalizador, o tempo de reação e o tipo de solvente e o fator combinado entre a quantidade de catalizador e o tipo de solvente. No caso da seletividade do aldeído camfolênico, não foi encontrado um fator significativo.

Palavras-chave: desenho de experimentos; isomerização; aldeído camfolênico; epóxido.

Introducción

De la isomerización de epóxidos de monoterpenos se obtienen productos de alto valor agregado, por ejemplo, de la isomerización del epóxido de β -pineno se obtienen alcohol perílico y mirtanal cuya aplicación se extiende incluso al tratamiento de enfermedades como el cáncer de próstata o el Alzheimer [1, 2]. El α -pineno, monoterpeno extraído del aceite de trementina [3], se puede epoxidar mediante sistemas catalíticos como complejos de metil-trioxorenio [4], ftalocianinas encapsuladas en sílica [5], nanopartículas de Au-Cu, Au-Co y Au-Ru [6], así como a través de materiales mesoporosos como la MCM-41 con Ti usando H_2O_2 como agente oxidante [4-7]. El epóxido de α -pineno **1** puede isomerizarse en productos termodinámicamente más estables como el aldehído canfolénico **2**, pinocarveol, *trans*-carveol **3**, pinocarveol **4**, entre otros (Figura 1). El interés en la reacción de apertura o isomerización de **1** se ha centrado en la síntesis de **2** por su amplia aplicación en la industria de fragancias [8].

Del mismo modo, se han reportado diferentes catalizadores homogéneos para la isomerización de **1** como el $ZnCl_2$ y $ZnBr_2$ de los cuales se obtuvieron como resultados 100% de conversión y selectividades mayores al 80% hacia **2** en la reacción de apertura de anillo de **1** [9]. Sin embargo, debido a la contaminación generada por el Zn y la compleja separación del catalizador en fase homogénea del medio de reacción, se han preferido diferentes catalizadores heterogéneos [10]. En este sentido, sílicas mesoporosas, modificadas con Fe como MMM-2 y VSB-5, han sido evaluadas para esta isomerización con resultados de conversiones del 95 y 97% y selectividades hacia **2** del 67 y 53%, respectivamente [10]. El uso de MCM-41, zeolitas (ZSM5 y beta-75), sílica y alúmina usando Fe como metal permitió encontrar que el material más activo para la obtención de **2** fue Fe-MCM-41 con una conversión del 100% y selectividad del 66% [11]. Este hecho se ha evidenciado principalmente por el tipo de acidez Lewis presente en el material: con un alto contenido de ácido Brønsted y solventes ligeramente polares como la acetona, y el acetato de etilo, se favorece la formación de **3**, mientras que **2** es obtenido bajo solventes apolares (como el tolueno) y presencia de acidez tipo Lewis (Figura 2).

El mecanismo de reacción se ha explicado con la formación de un carbocatión como intermedio que se estabiliza bajo solventes polares y genera la ruptura de la tensión estérica generada por el compuesto bicíclico para producir posteriormente compuestos termodinámicamente más estables como **2** y **3**.

Se han evaluado otros sistemas como Ce y Sn soportados en sílica en la isomerización de **1**. En este caso **3** y *trans*-sobrerol fueron obtenidos bajo condiciones básicas usando dimetilacetamida, sin embargo, se detectó lixiviación del metal [12]. Usando $SnCl_2$ como catalizador, la máxima conversión reportada fue del 100% y 70% de selectividad hacia **3** (0,5 h; 0,8 mmol de sustrato; dimetilacetamida; 140 °C), mientras que con $CeCl_3$ se reportó 100% de conversión y 42% de selectividad hacia el mismo producto (2 h; 0,8 mmol de sustrato; dimetilacetamida y 140 °C) [12]. Adicionalmente, diferentes ácidos Lewis como $FeCl_3$, $ZnCl_2$ y H_3BO_3 soportados en SiO_2 y TiO_2 fueron evaluados para el re-arreglo de **1**, obteniéndose principalmente **2** con una selectividad del 68% a una velocidad de $56 \times 10^2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}_{\text{cat}}$ (70 °C, ciclohexano como solvente, 300 mg de catalizador y 12 mM de **1**) [13]. De la evaluación de compuestos organometálicos (Al, Fe y Cr) en la reacción de isomerización de **1**, se obtuvo en el caso de Al^{3+} conversión del epóxido cercana al 100% y selectividad hacia **2** del 61%, mientras que para Fe se obtuvo selectividad hacia el mismo producto del 56% y, en el caso del Cr, 51% de selectividad (25 mmol de **1**, dicloroetano como solvente, 5 mg de catalizador, 30 °C y 30 min) [14]. Con sistemas organometálicos similares (benzotricarboxilatos) con Cu y usando 1,2-dicloroetano como solvente, se obtuvo 100% de conversión y 84% de selectividad hacia **2** (0,1 g de catalizador; temperatura ambiente; 0,1 g de **1** en 5 mL del solvente) [15].

Aunque se han reportado diferentes sistemas con metales como Fe, Cr, Co y Sn, el Cu soportado no ha sido estudiado detalladamente en sistemas mesoporosos para esta reacción particular. Estructuras metal-orgánicas (Cu-MOF) han sido utilizadas para la apertura de diferentes epóxidos con anilina y alcoholes a temperatura ambiente bajo condiciones libres de solventes [16]. En la reacción del epóxido de estireno con metanol para la producción del respectivo éster con Cu-MOF se reportó 98% de conversión y 99% de selectividad al respectivo producto (2-metoxi-2-fenil etanol). Con el catalizador homogéneo $Cu(NO_3)_2$ (10% mol) se obtuvieron conversiones mayores al 90% en la acidólisis en agua de ácidos del tipo α,β -epoxicarboxílicos a 30 °C [17]. En esta investigación se sintetizó el soporte MCM-41 y se modificó con Cu (mediante impregnación húmeda incipiente). Este sistema se evaluó en la reacción de isomerización de **1** usando diferentes condiciones de reacción (temperatura, cantidad de catalizador, tipo de solvente y tiempo) con un diseño central compuesto. Adicionalmente, mediante un análisis de superficie de respuesta se determinaron las condiciones óptimas de conversión de **1** y selectividad hacia **2**.

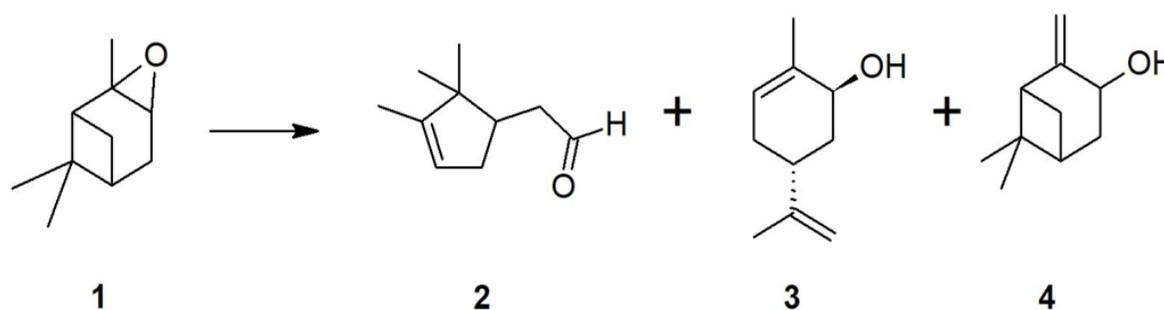


Figura 1. Isomerización del epóxido de α -pineno **1**: aldehído canfolénico **2**, *trans*-carveol **3** y pinocarveol **4**.

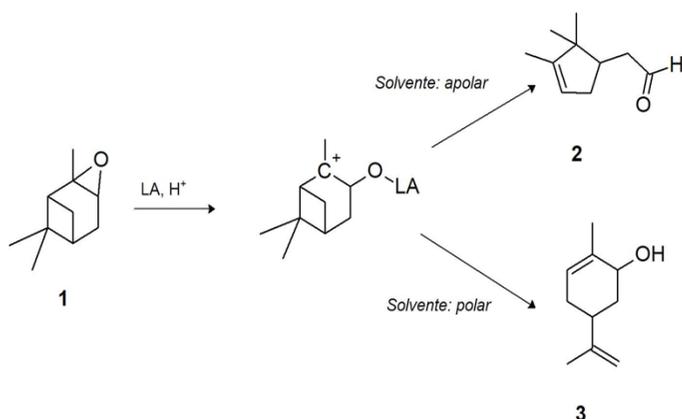


Figura 2. Formación de aldehído canfolénico **2** *trans*-carveol **3** usando un medio ácido tipo Lewis o básico tipo Brønsted. El primer paso y determinante de la reacción es la formación del carbocatión intermedio. LA = ácido de Lewis; H^+ = ácido de Brønsted. Modificado de [10-11].

Materiales y métodos

Síntesis de MCM-41 y Cu/MCM-41

Se sintetizó MCM-41 de acuerdo con lo reportado por Grün [18]. En una síntesis típica, 13,3474 g de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Aldrich, 97%) se agregaron a 60 mL de NH_4OH (Merck, 25%) y 720 mL de agua desionizada, bajo agitación constante durante 1 h hasta total disolución. Posteriormente, se añadieron 60 g de TEOS (tetraetilortosilicato, Aldrich, 98%) bajo atmósfera inerte y agitación (100 rpm). El sólido obtenido se lavó dos veces con agua desionizada y posteriormente se secó por 24 h a 100 °C. Finalmente, se calcinó a 550 °C por 5 h (a una velocidad de 1 °C/min); el sólido blanco obtenido fue denominado MCM-41. La modificación con Cu fue realizada por impregnación húmeda incipiente. Para ello, 2,7 mL de solución (0,057 g/mL) de la sal precursora ($Cu(NO_3)_2$, Aldrich 99,5%) se adicionaron gota a gota sobre el soporte (MCM-41), agitando magnéticamente por 1 h. Posteriormente, el material se secó a 100 °C por 8 h y se calcinó a 550 °C por 4 h a una velocidad de 4 °C/min.

Caracterización de los materiales

Los materiales fueron caracterizados por DRX, XPS, TPD- NH_3 , espectroscopia Raman y adsorción-desorción de N_2 . Los patrones de DRX fueron tomados en un difractor de polvo marca Bruker modelo D8 ADVANCE con geometría Da Vinci, bajo las siguientes condiciones de operación: voltaje de 40 kV, corriente de 40 mA con una rendija de divergencia de 0,6 mm, así como rendijas de soller primario y secundario a 2,5 °. El muestreo se realizó cada 0,02035 ° (2θ) con radiación $Cu K\alpha 1$ y filtro de níquel. El detector usado fue lineal Lynx-Eye con un barrido de 4 pasos y un tiempo de muestreo cada 0,6 s.

Los espectros Raman se adquirieron con un espectrómetro raman confocal marca Horiba Jobin Yvon, modelo LabRAM de alta resolución. Se usó una distancia confocal de 800 μm , tamaño para las manchas de laser entre 1 a 300 nm, detector CCD con resolución de 1024 x 256 pixeles, con una rendija de difracción de 1800 y 600 líneas/nm, resolución espectral de 0,3 cm^{-1} a 600 nm con 1800 líneas/mm, resolución espectral de un micrómetro lateral y dos micrómetros axial con excitación de 600 nm, láser de He/Ne de 633 nm de 17 mW y un láser de diodo de 785 nm a 80 mW.

Los análisis de adsorción-desorción de N_2 fueron realizados en un equipo Micromeritics AutoChem II 2920. Para ello, las muestras se desgasificaron antes del tratamiento a 250 °C durante 30 min a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y un flujo de 25 mL/min de 30% de N_2 en He. El área superficial se determinó con el análisis de un punto con N_2 a 77 K. Para los análisis TPD- NH_3 , las muestras se trataron a 400 °C por 50 min con un flujo continuo de He (80 mL/min) antes de la desorción de NH_3 . La desorción fue llevada a cabo hasta 700 °C con una velocidad de 10 °C/min.

El contenido metálico se determinó mediante espectroscopia de absorción atómica; 50 mg de catalizador se disolvieron en ácido clorhídrico y nítrico, y posteriormente se trató en calentamiento. El sobrenadante fue tratado con ácido sulfúrico y los filtrados fueron analizados en equipo de absorción atómica marca Philips modelo PU9100X.

Los espectros XPS fueron obtenidos en un espectrómetro fotoelectrónico de rayos X (NAP-XPS) marca Specs con un analizador PHOIBOS 150 1D-DLD, usando una fuente monocromática de Al-K α (1486,7 eV; 13 kV; 50 W para el espectro general y 100 W para el espectro de alta resolución) con energía de paso de 100 eV para el espectro general y 50 eV para el espectro de alta resolución. Adicionalmente, se usó el sistema de compensación de carga (Flood Gun) con una energía de 10 eV en todas las muestras.

Metodología computacional

La optimización de la estructura (geometría más estable) del epóxido de α -pineno se realizó utilizando la teoría de los funcionales de la densidad (DFT) con el funcional híbrido B3YLP y una base electrónica 6-31G con el programa Gaussian G09. Lo anterior se realizó con el objetivo de determinar las distancias de enlaces y el tamaño molecular asociado.

Actividad catalítica

La actividad catalítica y la optimización de la conversión de **1** y selectividad a **2** se evaluaron usando diferentes condiciones de reacción según lo establecido en un diseño central compuesto con cuatro factores y tres niveles (Tabla 1). Para ello se seleccionaron como factores del diseño experimental la cantidad de catalizador, temperatura, tiempo de reacción y el tipo de solvente (factor categórico que fue cuantificado usando el valor de la constante dieléctrica, ϵ). La cantidad de catalizador se varió entre 5 y 25 mg, la temperatura entre 50 y 70 °C, el tiempo entre 0,5 y 2,5 h. Los tipos de solventes evaluados fueron: etanol ($\epsilon = 24$), acetato de etilo ($\epsilon = 6$) y tolueno ($\epsilon = 2,4$). Las temperaturas seleccionadas fueron menores a los puntos de ebullición de los solventes. Los demás parámetros se escogieron teniendo en cuenta un diseño experimental realizado de manera aleatoria.

Las reacciones se realizaron en viales de 2 mL usando una solución 0,25 M (en el solvente correspondiente) de **1**, una velocidad de agitación de 750 rpm y catalizador con tamaño de partícula menor a 90 μm para eliminar los problemas de transferencia de masa externa e interna.

El seguimiento de los productos de la reacción fue realizado utilizando cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-MS, Agilent 7890A) con una columna DB-WAX (10 m x 0,05 mm x 0,20 μm) y condiciones estándares para el análisis (usando He como gas de arrastre; la temperatura del horno se mantuvo a 70 °C por 3 min y luego se aumentó a 10 °C/min hasta 180 °C, temperatura a la cual permaneció por 1 min). La conversión y selectividad fue calculada según las ecs. (1) y (2), respectivamente:

$$\% \text{Conversión} = \left(\frac{A_i - A_f}{A_i} \right) * 100\% \quad (1)$$

$$\% \text{Selectividad} = \left(\frac{A_{pi}}{\sum A_p} \right) * 100\% \quad (2)$$

Donde A_i y A_f son las áreas iniciales y finales de 1, respectivamente. A_{pi} corresponde al área del producto de interés y el denominador en la ecuación (2) corresponde a la suma de todas las áreas de los productos detectados por el cromatógrafo de gases. El tratamiento estadístico y la modelación usando una superficie de respuesta fue analizado usando el paquete Statgraphics®. Los datos experimentales se ajustaron a una ecuación polinómica de segundo grado.

Resultados y discusión

Caracterización del catalizador

Los difractogramas obtenidos antes y después de la incorporación de Cu se presentan en la Figura 3. En el caso del patrón de DRX de la MCM-41 sin modificar presenta tres picos característicos asociados a los índices (1 0 0), (1 1 0) y (2 1 0) (*PDF 00-049-1711*) en las posiciones $2\theta = 2,8^\circ$; $4,8^\circ$ y $5,5^\circ$; estas señales indican un orden hexagonal mesoporoso típico en este tipo de material [19]. Usando la reflexión de mayor intensidad que corresponde al pico mejor definido (asociado con el plano (1 0 0)), es posible estimar el tamaño de partícula del cristal formado utilizando la ecuación de Scherrer, ec. (3) [20]:

$$d = \frac{0,94 \lambda}{d \cos \theta} \quad (3)$$

Donde λ corresponde a la longitud de onda utilizada en el experimento (0,1541 nm), d es la distancia en el pico a la mitad de la altura, y θ el ángulo en radianes del pico. El tamaño del cristal asociado al dominio cristalino (1 0 0) del soporte (MCM-41) calculado con la ec. (3) fue de 0,48 nm. En el caso del material modificado con Cu (Figura 3), el pico asociado al plano (1 0 0) de la MCM-41 disminuye considerablemente y desaparece totalmente el pico asociado al plano (2 1 0). Adicionalmente, en el caso del plano (2 0 0) se observa un corrimiento con respecto al material sin modificar, esto puede estar asociado a la pérdida del arreglo ordenado, característico en este tipo de materiales [21]. En el caso de Cu/MCM-41 (Figura 3), se observan las señales características del CuO (*PDF 00-005-0661*) a los siguientes ángulos (2θ) = 32,6; 35,5; 38,9; 48,7; 53,41; 58,31; 61,6; 66,2; 68,1; 72,4° relacionados respectivamente con los planos (1 1 0), (-1 1 1), (2 0 0), (-2 0 2), (0 2 0), (2 0 2), (-1 1 3), (-3 1 1), (2 2 0) y (3 1 1).

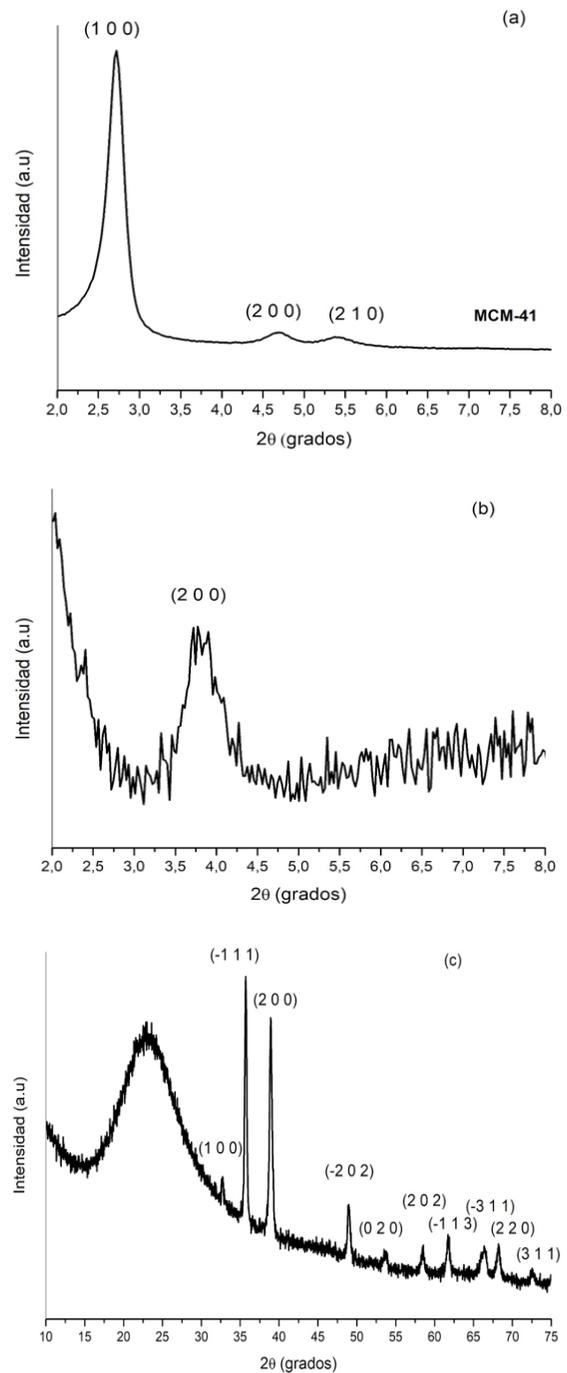


Figura 3. Patrón DRX de MCM-41 (a) y Cu/MCM-41 a ángulos bajos (b) y Cu/MCM-41 a ángulos altos (c).

En el espectro Raman (Figura 4) se observan los picos característicos de la MCM-41 a 440, 595, 710 y 982 cm^{-1} relacionados con las vibraciones simétricas y asimétricas del enlace Si-O-Si, que está directamente asociado con los defectos de red como los grupos silanoles superficiales [22]. En el caso de la modificación con Cu, se observa la pérdida de la señal asociada a la vibración simétrica del enlace Si-O-Si en 440 cm^{-1} , lo cual puede verificar la presencia del metal en la red del material. Sin embargo, las señales típicas en 296 y 346 cm^{-1} , relacionadas con la formación de CuO, y una señal en 623 cm^{-1} , asociada con la formación de una menor fase de Cu_2O , evidencian la presencia de Cu sobre la superficie de la MCM-41 [23].

Tabla 1. Diseño central compuesto: cuatro factores-tres niveles.

Corrida	Cantidad de catalizador (mg), x_1	Temperatura ($^{\circ}$ C), x_2	Tiempo (h), x_3	Tipo de solvente (ϵ , a.u.), x_4	x_1	x_2	x_3	x_4
	Factores				Codificación de las variables			
1	5	50	2,5	6	-1	-1	1	0
2	5	50	0,5	24	-1	-1	-1	1
3	15	60	2,5	2,4	0	0	1	-1
4	5	70	2,5	24	-1	1	1	1
5	5	70	0,5	6	-1	1	-1	0
6	15	50	1,5	2,4	0	-1	0	-1
7	15	60	1,5	2,4	0	0	0	-1
8	25	50	2,5	6	1	-1	1	0
9	5	70	0,5	24	-1	1	-1	1
10	25	70	2,5	24	1	1	1	1
11	25	70	2,5	6	1	1	1	0
12	15	60	1,5	2,4	0	0	0	-1
13	25	70	0,5	6	1	1	-1	0
14	15	70	1,5	2,4	0	1	0	-1
15	25	50	0,5	6	1	-1	-1	0
16	5	50	0,5	6	-1	-1	-1	0
17	15	60	0,5	2,4	0	0	-1	-1
18	25	50	2,5	24	1	-1	1	1
19	25	60	1,5	2,4	1	0	0	-1
20	5	60	1,5	2,4	-1	0	0	-1
21	15	60	1,5	24	0	0	0	1
22	25	50	0,5	24	1	-1	-1	1
23	5	70	2,5	6	-1	1	1	0
24	25	70	0,5	24	1	1	-1	1
25	15	60	1,5	6	0	0	0	0
26	5	50	2,5	24	-1	-1	1	1

Las propiedades texturales y el análisis de acidez de los materiales MCM-41 y Cu/MCM-41 se presentan en la Tabla 2. Se observa que la incorporación de Cu en el soporte disminuye considerablemente el área superficial del material y el volumen del poro disponible para la reacción. Como el diámetro cinético del sustrato (6,9356 Å), estimado usando la optimización de la estructura con Gaussian G09 (B3YLP/6-31G; Figura 5), es menor al volumen de los poros del catalizador, se asumiría que la reacción de isomerización ocurrirá sobre la superficie y dentro de los poros del material (el diámetro cinético se encuentra dentro del orden de microporosidad).

La impregnación con Cu aumenta considerablemente en el soporte la acidez fuerte (Tabla 2). En el caso del material sin modificar, la acidez está asociada a los grupos hidroxilos y al átomo de silicio que se encuentran en la superficie (grupos silanoles vecinales). Algo similar fue encontrado en el caso de zeolitas como ZSM-5 modificado con Cu en donde, con respecto al soporte, la incorporación de Cu generaba un aumento en la acidez fuerte y disminuía la cantidad de sitios débiles disponibles en el material [24].

Tabla 2. Propiedades texturales y porcentaje de metal del soporte MCM-41 y Cu/MCM-41.

Material	Volumen de poro (m ³ /g)	Área superficial (m ² /g)	Acidez (mmol NH ₃ /g)			% Metal*
			Baja (110 °C)	Media (350 °C)	Alta (550 °C)	
MCM-41	n.d.	700,38	0,1872	0,4821	2,0542	n.a.
Cu/MCM-41	0,1652	475,39	0,6440	0	2,7103	4,5

*Determinado por análisis de absorción atómica. n.a.= no aplica. n.d. = no determinado.

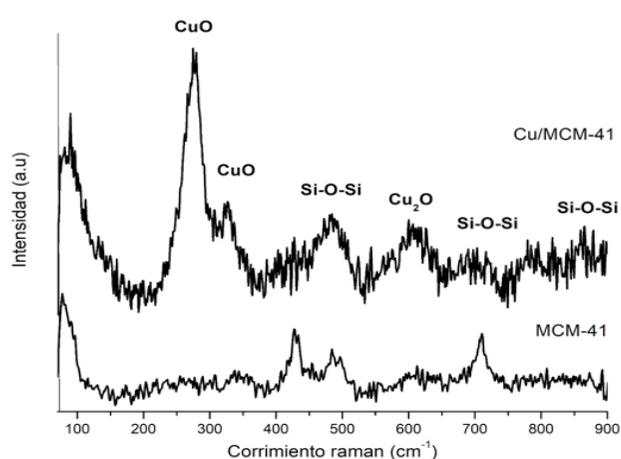


Figura 4. Espectro Raman del catalizador Cu/MCM-41 y del soporte MCM-41.

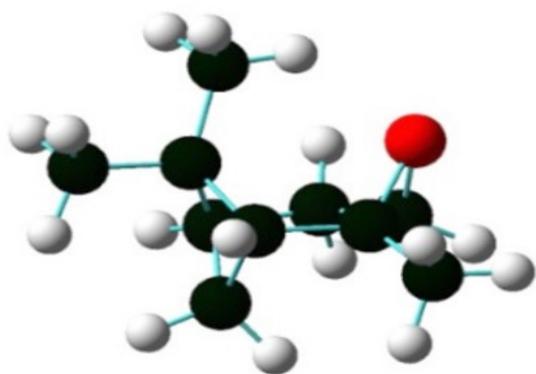


Figura 5. Estructura optimizada del óxido de α -pineno usando B3YLP/6-31G.

El espectro XPS del material modificado con Cu se presenta en la Figura 6. En el caso del material Cu/MCM-41 en el barrido general se observan las señales típicas del Si(2s), O(1s) y Cu(2p). Específicamente, el espectro XPS de alta resolución para el O(1s) (Figura 6(c)) en 530 eV puede estar relacionado con la presencia de O²⁻ en la fase de CuO que fue evidenciado en los análisis de difracción de rayos X, pero también a una pequeña cantidad de Cu₂O, dado que este último tiene una posición alrededor de 530,4 eV [25-26].

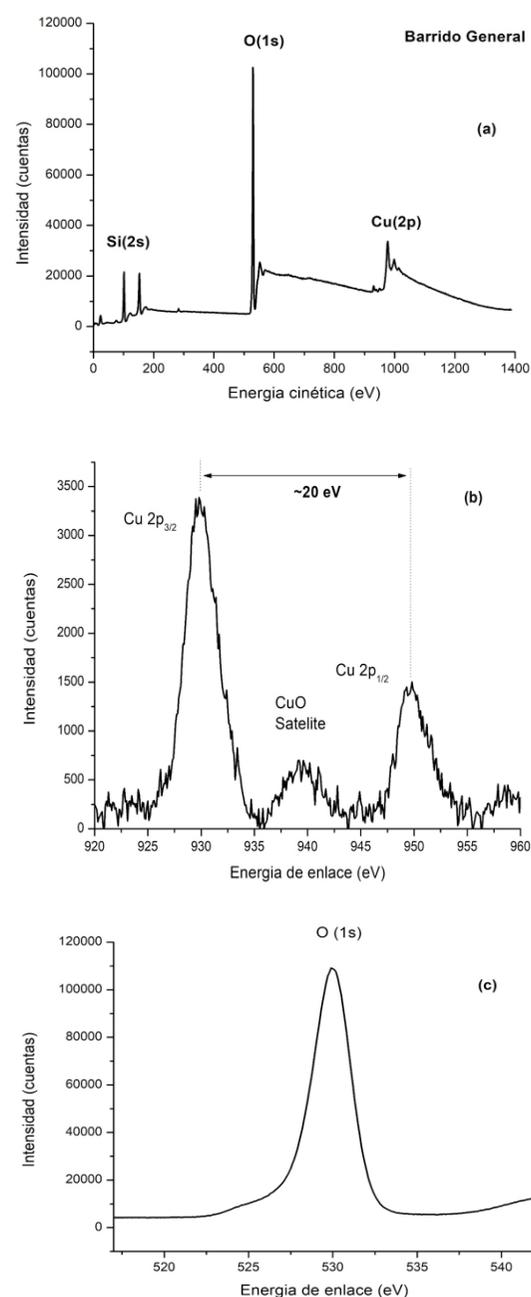


Figura 6. Espectros XPS: Barrido general (a) y de alta resolución para Cu (2p) (b) y O (1s) (c).

Análisis del diseño experimental y superficie de respuesta

En esta sección se describe la aplicación del diseño experimental central compuesto a los factores que afectan la isomerización de **1**. Reportes previos han permitido concluir que la cantidad de catalizador, el tiempo de reacción, la temperatura, así como el uso de solventes apolares como tolueno son los factores que afectan el rendimiento de formación del compuesto **2** [11, 12, 31]. El análisis de los efectos principales y del diagrama de Pareto se muestra en la Figura 7. Con respecto a la selectividad hacia **2** con Cu/MCM-41, la gráfica de efectos principales muestra que, al aumentar la cantidad de catalizador, aumenta la selectividad hasta alrededor de 40% y, posteriormente, disminuye hasta cerca del 20%. La tendencia observada con la temperatura es similar, pero con un cambio más notorio en la selectividad. Esto es contrario al comportamiento del tiempo de reacción, en el que se encuentra el valor máximo de selectividad. Un aumento en la polaridad del solvente disminuye considerablemente la selectividad hacia **2**, lo cual coincide con lo reportado previamente por Stekrova *et al.* [11] (tolueno, 70 °C, Fe/MCM-41), en donde el uso de solventes apolares (de menor constante dieléctrica) favorece la formación de **2**, mientras que el uso de solventes polares favorece la formación de *trans*-carveol (ambos isómeros corresponden a los productos termodinámicamente más estables de la reacción de apertura de **1**).

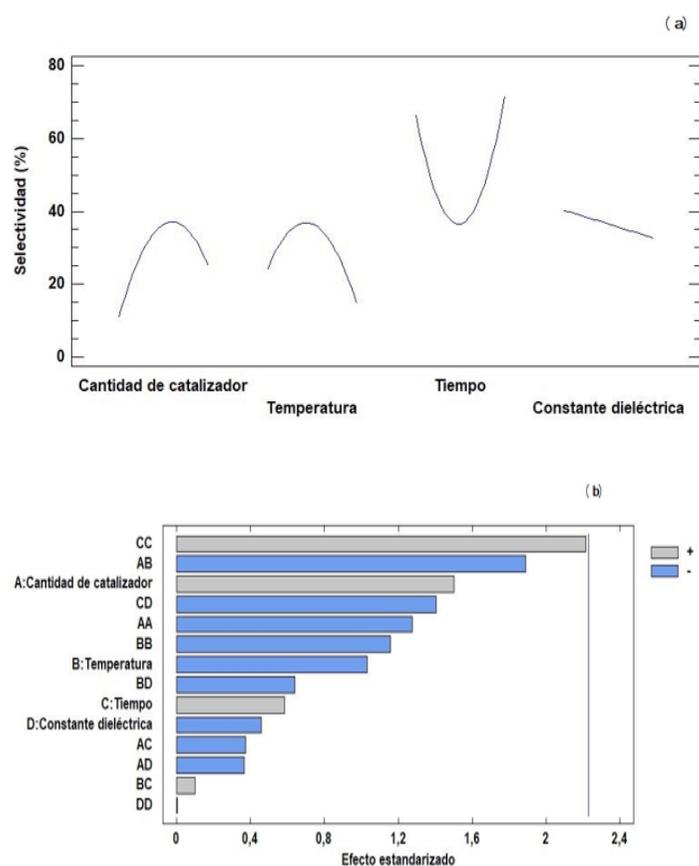


Figura 7. Efectos principales en la selectividad (a) para los diferentes factores estudiados y diagrama de Pareto para las combinaciones y efectos únicos en la selectividad (b).

En el diagrama de Pareto para la selectividad (Figura 7(b)) se observa que los factores que tienen un efecto positivo son la cantidad de catalizador, el tiempo de reacción y los factores combinados de temperatura y tiempo, así como el efecto de doble tiempo. En comparación con lo encontrado en la conversión, se observa que el tiempo de reacción y la cantidad de catalizador, así como los efectos combinados de temperatura y tiempo, y de cantidad de catalizador y polaridad del solvente, y efectos dobles de constante dieléctrica, tiempo y temperatura son los que presentan el mayor efecto en la conversión. Entre estos factores, el mayor efecto sobre la conversión lo presenta el efecto doble de la constante dieléctrica. Solo en algunos casos se evidenció que la cantidad de catalizador y el tiempo de reacción es el que presenta el mayor efecto sobre la conversión.

El análisis ANOVA para la conversión y selectividad se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente. En el caso de la selectividad, no se encontraron factores que afecten significativamente el modelo. Sin embargo, valores muy cercanos al valor estándar de P ($P < 0,05$) indican que el factor doble del tiempo es el que tiene más significancia. El valor de regresión para el polinomio de grado 2 ajustado para este modelo fue de 69,1251. Algo similar fue encontrado con el ANOVA realizado para la conversión: según el valor P encontrado (Tabla 4) para cada uno de los factores evaluados, ninguno tiene efecto significativo. Sin embargo, el factor doble del tiempo se encuentra muy cercano al valor P admitido ($< 0,05$) para ser significativo. En este caso, el valor de ajuste a un modelo polinómico de segundo grado fue 63,8241. Adicionalmente, el error total generado en la conversión es mayor que en el caso de la selectividad (7111,42 vs 3774,62; Tabla 3 y Tabla 4, respectivamente).

Tabla 3. Análisis ANOVA para la selectividad.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Cantidad de catalizador	849,709	1	849,709	2,25	0,1644
B: Temperatura	402,696	1	402,696	1,07	0,3260
C: Tiempo	128,273	1	128,273	0,34	0,5728
D: Constante dieléctrica	79,0863	1	79,0863	0,21	0,6569
AA	614,803	1	614,803	1,63	0,2307
AB	1349,45	1	1349,45	3,58	0,0879
AC	52,647	1	52,647	0,14	0,7166
AD	50,7399	1	50,7399	0,13	0,7215
BB	504,256	1	504,256	1,34	0,2746
BC	3,78326	1	3,78326	0,01	0,9222
BD	154,787	1	154,787	0,41	0,5363
CC	1849,41	1	1849,41	4,90	0,0513
CD	745,216	1	745,216	1,97	0,1903
DD	0,00969628	1	0,00969628	0,00	0,9961
bloques	147,46	1	147,46	0,39	0,5459
Error total	3774,62	10	377,462		
Total (corregido)	12225,5	25			

Tabla 4. Análisis ANOVA para la conversión.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Cantidad de catalizador	1001,7	1	1001,7	1,41	0,2627
B:Temperatura	779,556	1	779,556	1,10	0,3197
C:Tiempo	795,461	1	795,461	1,12	0,3151
D:Constante dieléctrica	210,026	1	210,026	0,30	0,5987
AA	857,794	1	857,794	1,21	0,2978
AB	95,3959	1	95,3959	0,13	0,7218
AC	160,704	1	160,704	0,23	0,6447
AD	55,8688	1	55,8688	0,08	0,7850
BB	32,9233	1	32,9233	0,05	0,8340
BC	69,7033	1	69,7033	0,10	0,7607
BD	60,3595	1	60,3595	0,08	0,7767
CC	40,9485	1	40,9485	0,06	0,8152
CD	320,44	1	320,44	0,45	0,5173
DD	2888,79	1	2888,79	4,06	0,0715
Bloques	142,856	1	142,856	0,20	0,6636
Error total	7111,42	10	711,142		
Total (corregido)	19657,9	25			

La ecuación polinómica de segundo grado con $R^2 = 0,6309$, obtenida para la predicción de la conversión corresponde a la ec. (4):

$$\text{Conversión} = 398,42 + 10,0336x_1 - 12,0009x_2 - 31,8613x_3 - 14,3230x_4 - 0,26574x_1^2 - 0,0188x_1x_2 - 0,1875x_1x_3 + 0,0041x_1x_4 + 0,0943x_2^2 + 0,2750x_2x_3 - 0,0049x_2x_4 + 9,9286x_3^2 - 0,4086x_3x_4 + 0,5415x_4^2 \quad (4)$$

En el caso de la selectividad a aldehído canfolénico, la ecuación obtenida para este modelo de superficie de respuesta ($R^2 = 0,6791$) corresponde a la ec. (5):

$$\text{Selectividad} = -439,291 + 13,4431x_1 + 15,1252x_2 - 108,754x_3 + 1,1586x_4 - 0,2331x_1^2 - 0,0875x_1x_2 - 0,025x_1x_3 - 0,0389x_1x_4 - 0,1181x_2^2 + 0,1125x_2x_3 - 0,0183x_2x_4 + 37,6905x_3^2 - 0,6473x_3x_4 + 0,0317x_4^2 \quad (5)$$

La Figura 8 presenta las superficies de respuesta estimadas y obtenidas para la conversión y selectividad. Para la selectividad en función de la cantidad de catalizador y temperatura de reacción (Figura 8(a)), y cantidad de catalizador y tiempo de reacción (Figura 8(b)), se determinaron los máximos correspondientes para la obtención de 2. En la Figura 8(b) se observa una región en donde se obtiene un 100% de selectividad, justamente en la región comprendida entre 5 mg y 1 h de reacción para tolueno como solvente. Particularmente, en el caso del etanol se presenta reacción de solvólisis generado por la inducción del ion etanoato al sitio electrodeficiente del epóxido como ha sido previamente reportado en epóxidos cíclicos como el epóxido de estireno [32].

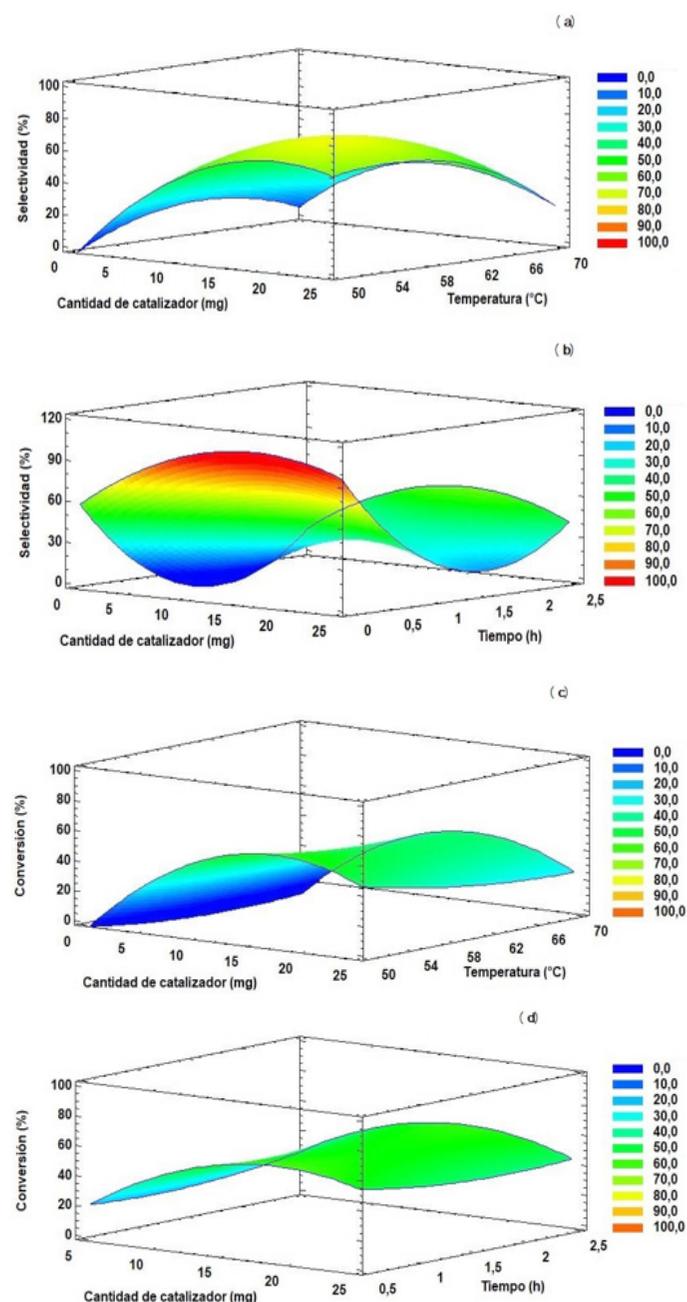


Figura 8. Superficies de respuesta estimadas para la selectividad hacia aldehído canfolénico y conversión de epóxido de α -pineno: (a) selectividad en función de la cantidad de catalizador y temperatura, (b) selectividad en función de la cantidad de catalizador y del tiempo, (c) conversión en función de la cantidad de catalizador y temperatura, (d) conversión en función de la cantidad de catalizador y tiempo.

En el caso de las superficies de respuesta de las Figura 8(c) y (d) no se observan regiones con el 100% de conversión. Sin embargo, durante los diferentes ensayos experimentales se determinó que con 25 mg de catalizador y 2,5 h de reacción se obtienen valores muy cercanos al 100% de conversión. Después de la obtención y aplicación de la superficie de respuesta, se obtuvieron los valores de optimización para la conversión y selectividad (Tabla 5).

Tabla 5. Valores óptimos de selectividad y conversión.

Factor	Valor óptimo para obtener 83,7% de selectividad	Valor óptimo para obtener 75,4% de conversión
Cantidad de catalizador (mg)	17	16
Temperatura (°C)	59	50
Tiempo (h)	2,5	2,5
Constante dieléctrica	2,4	2,4

El valor máximo obtenido para la selectividad es cercano al 84%. Los valores de cantidad de catalizador, temperatura, tiempo y constante dieléctrica del solvente están muy cercanas al valor óptimo obtenido para la conversión. Esta predicción realizada por el modelo polinómico de segundo grado se encuentra en buen ajuste por lo establecido experimentalmente. Adicionalmente, este es el primer reporte en la literatura con catalizadores de Cu en materiales mesoporosos y la consideración del estudio de superficie de respuesta para la obtención del compuesto **2**. Finalmente, se observa en las Figuras 9(a y b) la correlación entre los resultados experimentales para la conversión del epóxido de α -pineno y selectividad de aldehído canfolénico con respecto a los predichos en las ecuaciones obtenidas para los modelos de superficie (Ecs. (4) y (5)). La distribución obtenida en ambos casos es dispersa respecto a la línea de 45°, aunque se observa una mejor predicción de la selectividad a aldehído canfolénico que de la conversión del epóxido α -pineno.

Conclusiones

En el material obtenido por incorporación de Cu sobre la superficie del material mesoporoso MCM-41, se identificó la presencia de CuO y una baja cantidad de Cu₂O, mediante DRX, XPS y espectroscopia Raman. Adicionalmente, se obtuvo un incremento en la acidez respecto al soporte. El catalizador Cu-MCM-41 se evaluó en la isomerización del epóxido de α -pineno para la obtención de aldehído canfolénico, desarrollándose un diseño experimental estadístico central compuesto. En este se encontraron las condiciones óptimas para la selectividad a aldehído canfolénico (17 mg de catalizador, 59 °C, 2,5 h de reacción, tolueno como solvente) y para la conversión (16 mg de catalizador, 50 °C, 2,5 h de reacción y tolueno como solvente) para las cuales se obtuvieron los valores máximos de conversión y selectividad de 84% y 75% (rendimiento del 63% hacia el aldehído canfolénico), respectivamente. El análisis de superficie de respuesta indicó que en ambos casos solo los factores combinados (del tiempo de reacción y tipo de solvente) son los que tienen una mayor significancia. Sin embargo, el ajuste de los datos experimentales a los modelos polinomiales de segundo grado presentó un factor de correlación (R^2) de 0,6694. Los datos aquí reportados sugieren las condiciones con las cuales se puede obtener aldehído canfolénico con una alta selectividad (84%) usando el sistema catalítico Cu soportado en MCM-41.

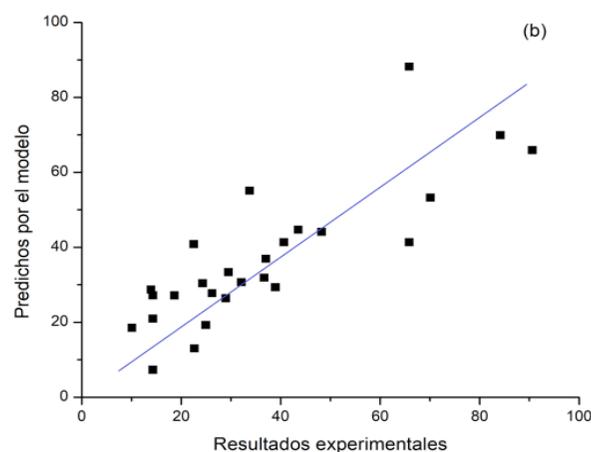
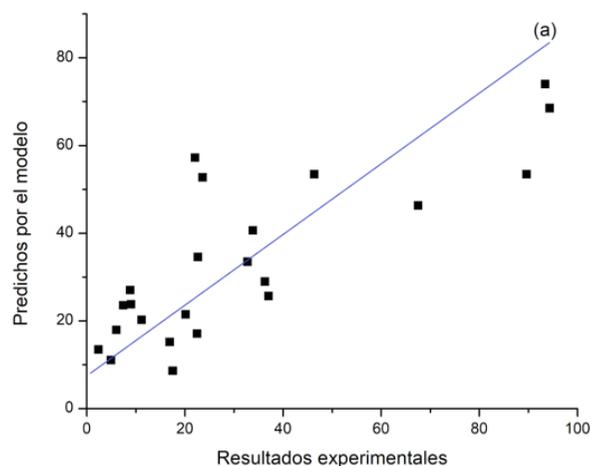


Figura 9. Correlación entre los resultados experimentales y los predichos por el modelo (representados por las ecuaciones (4) y (5)) para la conversión de epóxido de α -pineno (a) y para la selectividad a aldehído canfolénico (b).

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Antioquia (UdeA) y a Colciencias por la financiación del proyecto mediante el contrato CT-059-2016. J.S.-V. agradece a Colciencias (CT-059-2016) y la UdeA mediante el programa “Estudiante Instructor” por el apoyo económico para la realización de sus estudios doctorales.

Referencias

- [1] T. Chen, C. Da Fonseca, A. Schönthal. “Preclinical development and clinical use of perillyl alcohol for chemoprevention and cancer therapy” *Am. J. Cancer Res.* vol. 5, pp. 1580-1593, 2015.
- [2] D. Kauffmann, A. Dogra, M. Wink. “Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known alzheimer target” *J. Pharm. Pharmacol.* vol. 63, pp. 1368-1371, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01344.x>.

- [3] H. Pakdel, S. Sarron, C. Roy. "Alpha-terpineol from hydration of crude sulfate turpentine oil" *J. Agric. Food Chem.* vol. 49, pp. 4337-4341, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf010341b>.
- [4] T. Michel, D. Betz, M. Cokoja, V. Sieber, F. Kühn. "Epoxidation of alpha-pinene catalyzed by methyltrioxorhenium (VII): Influence of additives, oxidants and solvents" *J. Mol. Catal. A Chem.* vol. 340, pp. 9-14, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2011.03.017>.
- [5] J. Becerra, L. González, A. Villa. "Kinetic study of alpha-pinene allylic oxidation over FePcCl₁₆-NH₂-SiO₂ catalyst" *J. Mol. Catal. A Chem.* vol. 423, pp. 12-21, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2016.05.029>.
- [6] S. Ajaikumar, J. Ahlqvist, W. Larsson, A. Shchikarev, A. Leino, K. Kordas, J. Mikkola, Oxidation of alpha-pinene over gold containing bimetallic nanoparticles supported on reducible TiO₂ by deposition-precipitation method. *Appl. Catal., A* vol. 392, pp. 11-18, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2010.10.015>.
- [7] S. Casuscelli, G. Eimer, A. Canepa, A. Heredia, C. Poncio, M. Crivello, C. Perez, A. Aguilar, E. Herrero. "Ti-MCM-41 as catalyst for α -pinene oxidation: Study of the effect of Ti content and H₂O₂ addition on activity and selectivity" *Catal. Today*. vol. 133-135, pp. 678-683, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2007.12.104>.
- [8] P. Kunkeler, J. Van der Waal, J. Bremmer, B. Zuudeeg, R. Downing, H. Bekkum. "Application of zeolite titanium beta in the rearrangement of alpha-pinene epoxide to campholenic aldehyde" *Catal. Lett.* vol. 53, pp. 135-138, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1019049704709>.
- [9] J. Kaminska, M. Schwegler, A. Hoefnagel, V. Bekkum. "The isomerization of alpha pinene oxide with Brønsted and Lewis acids" *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*. vol. 111, pp. 432-437, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1002/recl.19921111004>.
- [10] M. Timofeeva, V. Panchenko, Z. Hasan, N. Khan, M. Mel'gunov, A. Abel, M. Matrosova, K. Volcho, S. Jhung. "Effect of iron content on selectivity in isomerization of α -pinene oxide to campholenic aldehyde over Fe-MMM-2 and Fe-VSB-5" *Appl. Catal., A* vol. 469, pp. 427-433, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2013.10.016>.
- [11] M. Stekrova, N. Kumar, A. Aho, I. Sinev, W. Grünert, J. Dahl, J. Roine, S. Arzumanov, P. Mäki-Arvela, D. Murzin. "Isomerization of alpha-pinene oxide using Fe- supported catalysts: Selective synthesis of campholenic aldehyde" *Appl. Catal., A*, vol. 470, pp. 162-176, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2013.10.044>.
- [12] V. Costa, K. Rocha, L. Sousa, P. Dutenhefner, E. Gusevskaya. "Isomerization of alpha-pinene oxide over cerium and tin catalysts: Selective synthesis of *trans*-carveol and *trans*-sobreol" *J. Mol. Catal. A Chem.* vol. 345, pp. 69-74, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2011.05.020>.
- [13] G. Neri, G. Rizzo, C. Crisafulli, L. De Luca, A. Donato, M. Musolino, R. Pietropaolo. "Isomerization of alpha-pinene oxide to campholenic aldehyde over Lewis acids supported on silica and titania nanoparticles" *Appl. Catal., A* vol. 295, pp. 116-125, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2005.07.027>.
- [14] M. Timofeeva, V. Panchenko, A. Abel, N. Abedin, I. Ahmed, A. Ayupov, K. Volcho, S. Jhung. "Rearrangement of alpha pinene oxide to campholenic aldehyde over the trimesate metal-organic frameworks MIL-100, MIL-110, MIL-96" *J. Catal.* vol. 311, pp. 114-120, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2013.11.006>.
- [15] L. Alaerts, E. Seguin, H. Poelman, F. Thibault-Starzyk, P. Jacobs, D. De vos. "Probing the lewis acidity and the catalytic activity of the metal-organic framework [Cu₃(btc)₂] (BTC=Benzen-1,3,5-tricarboxylate)" *Chem. Eur. J.* vol. 12, pp. 7353-7363, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/chem.200600220>.
- [16] J. Dongmei, T. Mallat, F. Krumeich, A. Baiker. "Copper-based metal-organic framework for the facile ring opening of epoxides" *J. Catal.* vol. 257, pp. 390-395, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2008.05.021>.
- [17] D. Amantini, F. Fringuelli, O. Piermatti, S. Tortoioli, L. Vaccaro. "Nucleophilic ring opening of 1,2-epoxides in aqueous medium" *Arkivoc.* vol. 11, pp. 293-311, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.3998/ark.5550190.0003.b26>.
- [18] M. Grün, K. Unger, A. Matsumoto, K. Tsutsumi. "Novel pathways for the preparation of mesoporous MCM-41 materials: control of porosity and morphology" *Microporous Mater.* vol. 27, pp. 207-216, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1387-1811\(98\)00255-8](https://doi.org/10.1016/S1387-1811(98)00255-8).
- [19] J. Aquino, C. Souza, A. Araujo. "Synthesis and characterization of sulfate-supported MCM-41 material" *Int. J. Inorg. Mater.* vol. 3, pp. 467-470, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1466-6049\(01\)00042-3](https://doi.org/10.1016/S1466-6049(01)00042-3).
- [20] M. Verma, V. Kumar, A. Katoch. "Sputtering based synthesis of CuO nanoparticles and their structural, thermal and optical studies" *Mater. Sci. in Semicond. Process.* vol. 76, pp. 55-60, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mssp.2017.12.018>.
- [21] M. Salam, M. Betiha, S. Shaban, A. Elsabagh, R. El-Aal, F. Kad., "Synthesis and characterization of MCM-41supported nano zirconia" *Egypt. J. Petrol.* vol. 24, pp. 49-57, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.02.005>.
- [22] G. Zhang, J. Long, X. Wang, Z. Zhang, W. Dai, P. Liu, Z. Li, L. Wu, X. Fu. "Catalytic role of Cu sites of Cu/MCM-41 in phenol hydroxylation" *Lang. Art.* Vol 26, pp. 1362-1371. DOI: <https://doi.org/10.1002/la.902436s>.
- [23] Y. Deng, A. Handoko, Y. Du, S. Xi, B. Siang. "In Situ raman spectroscopy of copper and copper oxides surfaces during electrochemical oxygen evolution reaction: Identification of Cu(II) oxides as catalytically active species" *ACS Catalysis*. vol. 6, pp. 2473-2481. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b00205>.
- [24] C. Li, J. Ma, Z. Xiao, S. Hector, R. Liu, S. Zuo, Z. Xie, A. Zhang, H. Wu, Q. Liu. "Catalytic cracking of *Swida wilsoniana* oil for hydrocarbon biofuel over Cu- modified ZSM-5 zeolite" *Fuel*. vol. 218, pp. 59-66, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.01.026>.
- [25] C. Oruc, A. Altindal. "Structural and dielectric properties of CuO nanoparticles" *Ceram. Int.* vol. 43, pp. 10708-10714, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.05.006>.
- [26] M. Natile, A. Galenda, A. Glisenti. "CuO/CeO₂ nanocomposites: an XPS study" *Surf. Sci. Spectra*. vol. 16, pp. 13-26, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1116/11.20061005>.
- [27] N. Pauly, S. Tougaard. "Primary excitation spectra in XPS and AES of Cu, CuO: Relative importance of surface and core hole effects" *Surf. Sci.* vol. 641, pp. 326-329, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.susc.2015.02.009>.
- [28] Z. Chen, B. Zhao, X. Fu, R. Sun, C. Wong. "CuO nanorods supported Pd nanoparticles as high performance electrocatalysts for glucose detection" *J. Electroanal. Chem.* vol. 807, pp. 220-227, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpsep.2017.05.016>.

[29] C. Dong, C. Chen, C. Kao, C. Hung. "Synthesis, characterization, and application of CuO-modified TiO₂ electrode exemplified for ammonia electro-oxidation" *Process Saf. Environ. Prot.* vol. 112, pp. 243-253, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.05.016>.

[30] M. Gopiraman, I. Chung. "Highly active and cost-effective CuO-based nanocomposite with unique morphology for catalytic synthesis of imines under solvent-free conditions" *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* vol. 81, pp. 455-464, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.08.021>.

[31] Y. Woong, N. Kim, W. Ahn, H. Rhee. "Redox mesoporous molecular sieve as a bifunctional catalyst for the one-pot synthesis of campholenic aldehyde from α -pinene" *J. Mol. Catal. A Chem.* vol. 174, pp. 249-254, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(01\)00192-3](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(01)00192-3).

[32] S. Bruno, A. Gomes, T. Oliveira, M. Antunes, A. Lopes, A. Valente, I. Goncalves, M. Pillinger. "Catalytic alcoholysis of epoxides using metal-free cucurbituril-based solids" *Org. Biomol. Chem. Comm.* vol. 14, pp. 3873-3877, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1039/c6ob00512h>.

Article citation:

J. E. Sánchez-Velandia & A. L. Villa-Holguín. "Optimización de la síntesis de aldehído canfolénico a partir del epóxido de α -pineno con Cu/MCM-41" *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 47, no. 3, pp. 13-23, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v47n3.72129>.

Purificación del fibrinógeno gamma A/gamma prima ($\gamma A/\gamma'$) por cromatografía líquida rápida de proteínas

Resumen

Una fracción del fibrinógeno circulante contiene una variante de la cadena γ que se origina por empalme alternativo del ARNm, denominada γ' cuya concentración en plasma se ha relacionado con un incremento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue diseñar un método de purificación del fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ más eficiente en relación a los descritos en la literatura, a partir de plasma humano. Se purificó el fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ a partir del fibrinógeno total obtenido por precipitación con β -alanina, mediante la separación por cromatografía líquida rápida de proteínas. Se confirmó la presencia de fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ mediante Western blot; su concentración fue determinada por ELISA. El método mostró ventajas en comparación con los métodos clásicos de separación, por ejemplo, que cantidades menores de muestra pudieron ser fraccionadas cuantitativamente en componentes puros en menor tiempo (30 min). Por tanto, se puede concluir que la técnica utilizada para la purificación de las variantes del fibrinógeno, correspondiente al Fg $\gamma A/\gamma A$ y Fg $\gamma A/\gamma'$, es un método de separación eficiente que permite purificar el Fg $\gamma A/\gamma'$ libre de contaminantes principales, como lo confirma la inmunolectroforesis.

Palabras clave: coagulabilidad; plasma; electroforesis; cadena γ' .

Purification of fibrinogen gamma A/gamma prima ($\gamma A/\gamma'$) by fast protein liquid chromatography

Abstract

A fraction of the circulating fibrinogen contains a variant of the γ chain that is originated by mRNA alternative splicing denominated γ' whose concentration in plasma has been related to an increase in the risk of cardiovascular diseases. Thus, the objective of this work was to design a more efficient $\gamma A/\gamma'$ fibrinogen purification method in relation to those described in the literature from human plasma. The $\gamma A/\gamma'$ fibrinogen was purified from the total fibrinogen obtained by precipitation with β -alanine, using separation by fast protein liquid chromatography. Fibrinogen $\gamma A/\gamma'$, was confirmed by Western blot and its concentration was determined by ELISA. The method showed advantages compared to classical separation methods, for example, smaller amounts of sample could be fractionated quantitatively into pure components in less time (30 min). Therefore, it can be concluded that the technique used for the purification of fibrinogen variants, corresponding to Fg $\gamma A/\gamma A$ and Fg $\gamma A/\gamma'$, is an efficient separation method that allows purifying the Fg $\gamma A/\gamma'$ free of main contaminants, as confirmed by immunoelectrophoresis.

Palabras clave: coagulability; plasma; electrophoresis; chain γ' .

Purificação do fibrinogênio gamma A/gamma prima ($\gamma A/\gamma'$) por cromatografia líquida rápida de proteínas

Resumo

Uma fração do fibrinogênio circulante contém uma variante da cadeia γ que origina-se por junção alternativa do ARNm, chamada γ' cuja concentração em plasma está associada com um incremento no resgo de sofrer doenças cardiovasculares. Assim, o objetivo em este trabalho foi desenhar um método de purificação do fibrinogênio $\gamma A/\gamma'$ mais eficiente em relação aos que estão descritos na literatura, a partir do plasma humano. Purificou-se o fibrinogênio $\gamma A/\gamma'$ a partir do fibrinogênio total conseguido pela precipitação com β -alanina, através da separação por cromatografia líquida rápida de proteínas. Se confirmou por Western blot o fibrinogênio $\gamma A/\gamma'$. A sua concentração foi determinada por ELISA. O método apresenta vantagens em comparação com os métodos clássicos de separação, por exemplo, quantidades menores de mostra podem ser fracionadas quantitativamente em componentes puros, em tempos mais curtos (30 min). Entao, pode-se concluir que a técnica utilizada, para a purificação das variantes do fibrinogênio correspondente ao Fg $\gamma A/\gamma A$ e Fg $\gamma A/\gamma'$, é um método de separação eficiente que permite purificar o Fg $\gamma A/\gamma'$ livre de contaminantes principais, como o confirma a imunolectroforese.

Palavras-chave: coagulabilidade; plasma; electroforesis, cadeia γ' .

Introducción

El fibrinógeno (Fg) es una glicoproteína plasmática sintetizada por los hepatocitos [1]. En la etapa final de la coagulación de la sangre, la trombina convierte el Fg soluble en monómeros de fibrina que posteriormente polimerizan y forman la fibrina insoluble, por acción del Factor XIII (FXIIIa). La transglutaminasa es activada fisiológicamente por la trombina en presencia de calcio [2, 3]. El Fg está formado por tres pares de cadenas polipeptídicas distintas ($A\alpha$, $B\beta$, y γ). Una variante de la cadena γ normal (γA) o la más abundante del Fg se produce por empalme alternativo del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), llamado gamma prima (γ') [4, 5]. Esta variante constituye un sitio de unión a la trombina de alta afinidad [6].

En la variante de Fg $\gamma A/\gamma'$ los últimos cuatro aminoácidos del extremo carboxi-terminal, alanina, glicina, aspártico y valina (AGDV), son reemplazados por una secuencia de 20 aminoácidos $\gamma'408-427$, VRPEHPAETHEYDS LYPEDDL. Los dos residuos de tirosina están sulfatados y hay tres residuos de ácido aspártico y cuatro de ácido glutámico, los cuales le confieren a esta variante un fuerte carácter electronegativo [7, 8]. Esta propiedad ha permitido separar por cromatografía de intercambio aniónico estas dos poblaciones del Fg [9]. A pH neutro, el Fg eluye con las dos cadenas γA ($\gamma A/\gamma A$) (pico 1; homodimérico), mientras que a pH mucho más ácido (tres órdenes de magnitud) eluye con las cadenas γA y γ' ($\gamma A/\gamma'$; heterodimérico). Algunos estudios clínicos han demostrado que los pacientes con una mayor proporción de $\gamma A/\gamma'$ tienen un riesgo mayor de padecer enfermedades cardiovasculares [10] como infarto del miocardio [11], enfermedad arterial coronaria [12] y accidentes cerebrovasculares [13].

Se han planteado diferentes hipótesis con el fin de explicar los efectos del Fg $\gamma A/\gamma'$ sobre la estructura y función de la fibrina [14]. La explicación a futuro sobre las implicaciones fisiopatológicas de la estructura del coágulo formado con una mayor proporción de fibrina $\gamma A/\gamma'$ puede ayudar al diagnóstico temprano y al tratamiento de determinadas enfermedades vasculares. Sin embargo, es difícil predecir la contribución pro o antitrombótica del Fg $\gamma A/\gamma'$ [15]. Considerando que los eventos cardiovasculares causan la interrupción del flujo sanguíneo y muerte celular debido a la formación de trombos de naturaleza oclusiva, resulta importante la investigación de las características de los coágulos formados con un elevado contenido de Fg $\gamma A/\gamma'$ y el diseño de estrategias para su disolución. Por lo cual, la purificación del Fg $\gamma A/\gamma'$ es un paso fundamental para conseguirlo.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue purificar la variante de Fg ($\gamma A/\gamma'$) a partir de plasma de individuos sanos, precipitando primero el Fg total con β -alanina y luego separando las dos poblaciones de Fg, $\gamma A/\gamma A$ y $\gamma A/\gamma'$ por cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC), por sus siglas en inglés), empleando una resina de intercambio iónico.

Materiales y métodos

Materiales

La trombina bovina y la mayor parte de los reactivos utilizados fueron grado analítico de la Compañía Sigma (St Louis, MO, USA). Los reactivos de electroforesis fueron adquiridos a través de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA).

El anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la cadena γ' humana (2.G2.H9) y la IgG de conejo anti-Fg humano marcado con biotina fueron adquiridos a través de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). El Fg $\gamma A/\gamma'$ comercial en Enzyme Research Laboratories, USA. Las placas de ELISA de máxima adsorción fueron adquiridas en Thermo Scientific Nunc (Harnover Par – IL, USA).

Toma de la muestra de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron de cinco voluntarios aparentemente sanos, previa lectura y firma del consentimiento informado. Se realizó una punción venosa a nivel del antebrazo, utilizando una aguja mariposa (o scalp) acoplada a una jeringa. Se recogió la sangre anticoagulada con citrato de sodio al 3,8% *p/v* en una proporción de 9:1 (sangre:anticoagulante), descartando los primeros 3 mL. El plasma se obtuvo por centrifugación a 2000 g durante 20 min y se le adicionaron los siguientes inhibidores de proteasas: 200 U/mL de aprotinina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM y benzamidina 5 mM. La muestra se distribuyó en alícuotas y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Grupo de estudio

El grupo estaba conformado por sujetos sanos (una mujer y cuatro hombres), con edades comprendidas entre 18-40 años, índice de masa corporal entre 18,5 y 24,5 kg/m² y concentración de Fg entre 2-4 mg/mL. Se excluyeron del estudio sujetos con hábitos tabáquicos o alcohólicos, presión arterial sistólica > 120 mm Hg y diastólica > 80 mm Hg, colesterol total > 200 mg/dL, triglicéridos > 150 mg/dL, sujetos con diabetes u otras patologías que pudieran alterar la distribución normal de las poblaciones de Fg.

Purificación de Fg total

La purificación de Fg se realizó a partir del plasma de cada individuo a través de la técnica de precipitación con β -alanina [16], con algunas modificaciones. Se pasó el plasma por una columna de lisina-sefariosa para eliminar el plasminógeno, según el método de Deutsch *et al.* [17]. Al plasma depletado de plasminógeno se le eliminaron las proteínas vitamina K dependientes: se agregó MgSO₄ a razón de 2,4 mg/mL de plasma y se agitó suavemente en un rotador de 360° durante 15 min a temperatura ambiente (TA). Luego se agregó BaSO₄ en una proporción de 90 g/L. Se agitó suavemente en un rotador de 360° durante 1 h a TA y luego se centrifugó a 2000 g durante 15 min a 4 °C. Se volvió a adsorber el sobrenadante con BaSO₄. Al sobrenadante obtenido se le agregó lentamente por goteo una solución de β -alanina 6 M y ácido ϵ aminocaproico (EACA) 0,1 M, hasta una concentración final de β -alanina de 2,7 M. Se mezcló suavemente durante 30 min a TA y se centrifugó a 2000 g por 30 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con tampón Tris-salino (TS) (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M) pH 7,4 y EACA 0,1 M. Se repitió el proceso de precipitación dos veces más y el último precipitado se resuspendió con tampón TS. La solución de Fg se dializó a 4 °C contra el tampón TS. La concentración de Fg purificado se determinó por espectrofotometría (Genesys 6, Spectronic Instruments, Rochester, NY, USA) a 280 nm, utilizando 1,51 como coeficiente de extinción molar del Fg [18]. También se determinó la concentración a través del método de Lowry [19], empleando albúmina sérica bovina como proteína estándar. La solución de Fg se distribuyó en alícuotas y se congelaron a -80 °C hasta su uso.

Medición de la funcionalidad (coagulabilidad) de la proteína purificada

La funcionalidad del Fg purificado se determinó para cada muestra por triplicado. La actividad coagulante del Fg purificado se evaluó empleando el siguiente protocolo: en un tubo de borosilicato de 10 x 75 mm, se formó un coágulo de fibrina con 200 µL de solución de Fg purificado y 200 µL de solución trombina bovina-cloruro de calcio (trombina 1,25 U/mL y CaCl₂ 5 mM, concentración final). Se colocó un aplicador de madera en el tubo que contenía la solución de Fg y se dejó coagular a 37 °C por 30 min. Se recogió el coágulo y se determinó la concentración de proteínas, por el método de Lowry en la solución de Fg purificado y en el sobrenadante obtenido luego de remover el coágulo. El porcentaje de coagulabilidad se calculó mediante la siguiente ecuación (1) [20]:

$$\% \text{Coagulabilidad} = \frac{[\text{Pr Solución Fg}] - [\text{Pr sobrenadante}]}{[\text{Pr Solución Fg}]} \times 100 \quad (1)$$

Donde Pr: Proteína; Fg: Fibrinógeno.

Para la realización de estudios funcionales se recomienda que la coagulabilidad del Fg purificado sea $\geq 90\%$.

Electroforesis

La integridad de las cadenas polipeptídicas del Fg purificado fue analizada por electroforesis (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, empleando la técnica de Laemmli [21]. Las corridas se realizaron a voltaje constante de 100 V durante 1 h; las bandas proteicas se visualizaron con azul de Coomassie R250 al 0,25% y se compararon con un patrón de Fg comercial.

Cuantificación del Fg $\gamma A/\gamma'$ por el método de ELISA

El Fg $\gamma A/\gamma'$ se cuantificó por ELISA [12], mediante el uso de un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la cadena γ' de origen humano (2.G2.H9). Este anticuerpo reconoce exclusivamente el Fg γ' y no tiene reacción cruzada con el Fg γA . El anticuerpo 2.G2.H9 se diluyó con tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 hasta una concentración 1,5 µg/mL. Se agregaron 50 µL de esta solución a cada pocillo de una placa de ELISA y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Luego se bloquearon los sitios inespecíficos mediante la adición de 250 µL de PBS-albúmina sérica bovina (BSA) al 4% y glucosa al 2%, por 90 min a 37 °C. Se lavó la placa tres veces con PBS, suplementado con Tween 20 al 0,05% y se añadió la solución de Fg purificado por FPLC, dejando reposar durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados como se indicó previamente y se adicionaron 50 µL de un segundo anticuerpo, IgG de conejo anti-Fg humano marcado con biotina, durante 1 h a 37 °C. Se colocaron 50 µL de estreptavidina peroxidasa, dejando reposar durante 20 min. La reacción se reveló con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) como sustrato cromogénico.

Se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 0,1 N y se leyó inmediatamente a 450 nm en un lector de ELISA INFINITE 200M (TECAN, Männedorf, Switzerland). La cuantificación de Fg $\gamma A/\gamma'$ en los eluatos de la columna se determinó por triplicado a partir de una curva estándar hecha con Fg $\gamma A/\gamma'$ comercial, en un rango de 0 µg/mL a 1,5 µg/mL. La tendencia lineal de la curva se ajustó con el método de mínimos cuadrados, empleando el programa de Microsoft Excel versión 2007.

Separación de la variante de Fg $\gamma A/\gamma'$ del Fg total

La variante de Fg ($\gamma A/\gamma'$) se purificó a partir de un Fg purificado con un 3% de Fg $\gamma A/\gamma'$ inicial, empleando FPLC, en un equipo AKTA purifier General Electric Company Healthcare, empleando una columna de intercambio aniónico. Se inyectaron 500 µL de la solución de Fg (4 mg/mL), en buffer Tris y purificado por β -alanina, a una columna de intercambio aniónico de HiPrep™ DEAE FF 16/10 (20 mL) (GE Healthcare). A continuación, se lavó la columna con 2 CV (CV: Volumen de la columna) del tampón de equilibrio A (H₃PO₄ 5 mM, Tris 0,039 M, pH 8,5). Luego se aplicó un gradiente no lineal, el cual se controló con el software UNICORN. El gradiente se formó mezclando el tampón A y el tampón B: H₃PO₄ 500 mM, Tris 0,5 M, pH 4,1. Ambos tampones fueron suplementados con aprotinina 5 KIU/mL, como se describe en la Tabla 1. La cromatografía se llevó a cabo a TA a una velocidad de flujo de 4 mL/min. Las fracciones proteicas eluidas se concentraron con amicon (Millipore), hasta obtener un volumen de 200 µL. La concentración de proteínas se determinó por espectrofotometría a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción del Fg: 1,51 M⁻¹·cm⁻¹. Se evaluó por electroforesis SDS-PAGE la integridad de las proteínas separadas por FPLC. La presencia de Fg $\gamma A/\gamma'$ se confirmó por *Western blotting* empleando el anticuerpo monoclonal de ratón 2.G2.H9 dirigido contra la secuencia de aminoácidos 408–427 de la cadena γ' de origen humano, en un sistema de transferencia (Bio-Rad, USA).

Tabla 1. Gradiente de elución empleado para la purificación de Fg $\gamma A/\gamma'$.

% v/v Tampón A (H ₃ PO ₄ 5 mM, Tris 0,039 M, pH 8,5)	% v/v Tampón B (H ₃ PO ₄ 500 mM, Tris 0,5 M, pH 4,1)	CV (Volumen de columna)
100	0	3
90	10	6
50	50	5
0	100	5

Resultados y discusión

Purificación de Fg

La fracción de Fg total purificada por β -alanina presentó una coagulabilidad de 90,0 \pm 0,5% y un rendimiento promedio del 85%. La pureza e integridad del Fg fue evaluada por electroforesis SDS - PAGE en un gel al 8% en condiciones reductoras.

En la Figura 1 se pueden apreciar las tres cadenas del Fg: $A\alpha$, $B\beta$ y γ , con pesos moleculares aparentes de aproximadamente 67, 57 y 47 kDa, respectivamente. Además, la preparación de Fg no estaba contaminada con plasminógeno.

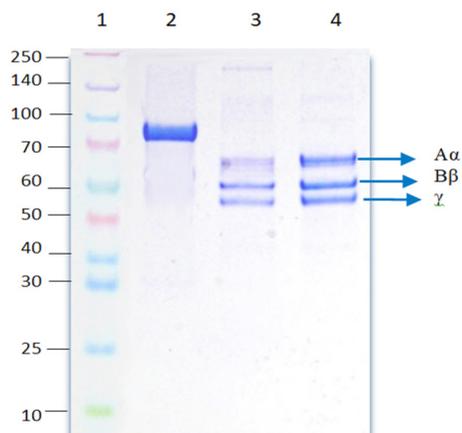


Figura 1. Electroforesis SDS- PAGE: gel al 8% en condiciones reductoras. Carril 1. Marcadores de peso molecular (kDa). Carril 2. Plasminógeno eliminado de la preparación de Fg. Carril 3. Fg comercial. Carril 4. Fg purificado por β -alanina.

Cromatografía líquida de separación rápida de proteínas

Las poblaciones de Fg $\gamma A/\gamma A$ y Fg $\gamma A/\gamma'$ presentes en el Fg precipitado por β -alanina se separaron por cromatografía, utilizando una columna de intercambio aniónico y un gradiente no lineal-partido, obteniéndose dos picos principales, el 1: $\gamma A/\gamma A$ y el 2: $\gamma A/\gamma'$ (ver Figura 2). El pico 1 eluyó con un tiempo de retención promedio de $22,2 \pm 0,5$ min y el pico 2 eluyó a $32,8 \pm 0,8$ min. Debido a la baja concentración del pico 2, se realizaron seis corridas con el FPLC, empleando el Fg purificado de un individuo (3% de Fg $\gamma A/\gamma'$, cuantificado previamente por ELISA) y luego se concentraron por separado las fracciones correspondientes al pico 1 y 2. La concentración promedio del pool de los dos picos concentrados se determinó por espectrofotometría a 280 nm, pico 1 = $2,20 \pm 0,07$ g/L y pico 2 = $0,25 \pm 0,05$ g/L (promedio \pm el error estándar). La Figura 3 corresponde al resultado del *Western blotting*.

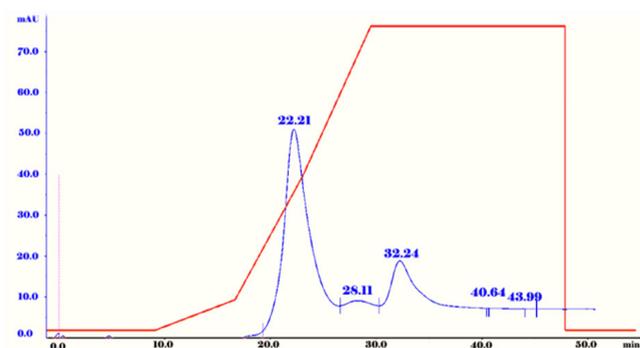


Figura 2. Perfil de elución del Fg $\gamma A/\gamma'$ por cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC). La columna utilizada fue de 20 mL (HiPrep™ DEAE FF 16/10 (GE Healthcare), velocidad de flujo 4 mL/min. El trazo de color rojo se corresponde al gradiente empleado para eluir al Fg $\gamma A/\gamma'$.

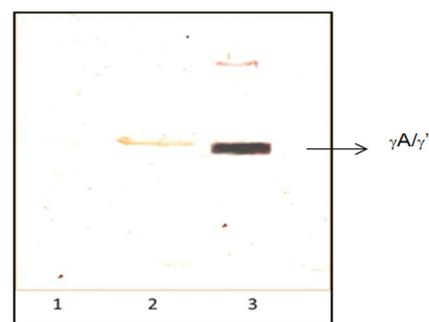


Figura 3. Inmuno-electroforesis de las dos poblaciones de Fg purificado por FPLC $\gamma A/\gamma A$ y $\gamma A/\gamma'$. Las muestras fueron analizadas en condiciones reductoras, utilizando el anticuerpo 2.G2.H9, monoclonal de ratón dirigido contra la cadena γ' humana. Revelado con 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno. Carril 1, pico 1 de Fg. Carril 2, pico 2 del Fg purificado. Carril 3. Fg $\gamma A/\gamma'$ comercial.

Cuantificación de Fg $\gamma A/\gamma'$

Se desarrolló la técnica de ELISA tipo sándwich con el anticuerpo monoclonal 2.G2.H9. El Fg $\gamma A/\gamma'$ se une específicamente al anticuerpo inmobilizado y es reconocido por un segundo anticuerpo, un anti-Fg humano marcado con biotina, acoplado a una enzima marcada. Se realizó una curva estándar (ver Figura 4) usando diferentes concentraciones de Fg $\gamma A/\gamma'$ comercial. La concentración de Fg $\gamma A/\gamma'$ en el Fg purificado por β -alanina para cada muestra de plasma obtenido de cada individuo se calculó a partir de la curva estándar. La concentración promedio de Fg $\gamma A/\gamma'$ \pm el error estándar fue de $0,22 \pm 0,16$ g/L, con un coeficiente de variabilidad del 0,72%. Este resultado concuerda con los reportados en otros estudios [12, 22]. Lovely *et al.* [22] evaluaron la relación de Fg $\gamma A/\gamma'$ con enfermedades cardiovasculares, utilizando un inmunoensayo. Determinaron que la concentración de esta variante en plasma de individuos sanos se encuentra en un rango de 0,088 – 0,551 g/L. Por lo tanto, se puede concluir que el ELISA estandarizado en el presente trabajo es de gran utilidad para la determinación de Fg $\gamma A/\gamma'$ en plasma y podría facilitar futuros estudios de esta variante, marcador de riesgo para las enfermedades cardiovasculares [23, 24].

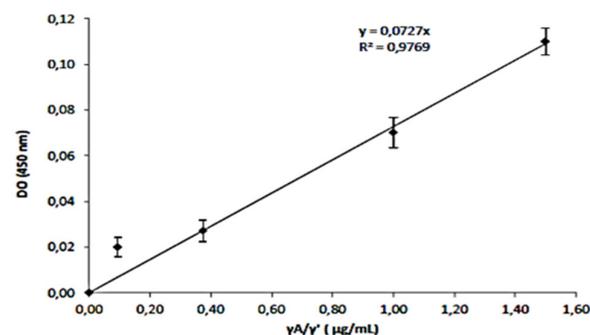


Figura 4. Curva de calibración para la cuantificación de Fg $\gamma A/\gamma'$.

La cadena γ del Fg presenta dos isoformas como consecuencia del empalme alternativo del ARNm: la isoforma γA , constituida por 411 aminoácidos, la cual representa entre el 90 y 95% del Fg [25] y la $\gamma A/\gamma'$, formada por 427 aminoácidos, con una secuencia única después de la posición 407, la cual constituye aproximadamente entre el 10-15% del Fg total en plasma.

Sin embargo, este porcentaje puede variar, particularmente en condiciones patológicas donde el porcentaje de cadena $\gamma A/\gamma'$ aumenta, por ejemplo en pacientes con enfermedades arteriales coronarias e infarto del miocardio [22].

Diversos estudios han sugerido que el aumento en la proporción de la variante de Fg $\gamma A/\gamma'$ altera la formación y la estructura de la fibrina, por lo que el plasma procedente de pacientes con desórdenes tromboticos forman coágulos más rígidos y menos permeables en comparación con los coágulos formados a partir del plasma de individuos sanos [14, 26]. Cheung *et al.* [27] reportaron que la concentración de Fg γ' se encuentra aumentada en pacientes con embolia pulmonar en fase aguda ($0,79 \pm 0,33$ g/L) en relación a controles sanos ($0,33 \pm 0,10$ g/L). También hay evidencias de que la concentración de Fg $\gamma A/\gamma'$ aumenta en la fase aguda en pacientes que han sufrido un accidente vascular del cerebro ($0,42 \pm 0,17$ g/L) en comparación con los controles ($0,34 \pm 0,10$ g/L) [13].

El Fg $\gamma A/\gamma'$ tiene propiedades bioquímicas y biofísicas que son diferentes al Fg γ_A . Algunos estudios han demostrado que el Fg $\gamma A/\gamma'$ se une a la trombina con gran afinidad [2, 6, 28] uniéndose, a su vez, al exosito II de la misma. Otros estudios han reportado que la cadena $\gamma A/\gamma'$ tiene la propiedad de unir FXIII [29-31], aunque otras investigaciones no confirmaron esta interacción [32].

Durante los últimos años, los métodos de separación y purificación de proteínas han avanzado notablemente. Algunos de estos avances están relacionados con la introducción de procedimientos de cromatografía líquida de alto rendimiento. Las ventajas de estos métodos son: excelente poder de resolución, velocidad de separación y alta sensibilidad [33]. Diferentes estudios [33-37], han demostrado que los péptidos y proteínas de mayor peso molecular han sido separados ocasionalmente por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento. El fracaso en la obtención de resultados puede estar relacionada con el sistema de disolventes y la columna empleada, razón por la cual se han implementado otros sistemas de cromatografía.

Los estudios sobre la variante de Fg $\gamma A/\gamma'$ actualmente son de considerable interés, debido a que su relación estructura-función aún permanece en investigación [30]. Bajo este contexto, para realizar cualquier estudio sobre esta variante es imprescindible su separación y purificación. Los pioneros en la purificación de Fg $\gamma A/\gamma'$ fueron Finlayson, Mosesson, Siebenlist *et al.* [30, 38], quienes utilizaron una cromatografía de intercambio iónico con una columna de DEAE – celulosa. Siebenlist utilizó la técnica de Finlayson con algunas modificaciones con el fin de obtener una mejor resolución de la fracción correspondiente al Fg $\gamma A/\gamma'$, empleando un gradiente cóncavo, controlado por el sistema de cromatografía de separación rápida de proteínas (FPLC). Con el objetivo de purificar la fracción del fibrinógeno total correspondiente al heterodímero Fg $\gamma A/\gamma'$, nosotros describimos un método eficiente, utilizando el sistema de cromatografía FPLC, mediante el cual se controló el programa de gradiente utilizado.

En el presente trabajo se diseñó un gradiente de elución con cuatro segmentos a diferencia de los utilizados por Siebenlist *et al.* [30] (13 segmentos) y la separación del pico 2 se logró en un menor tiempo (30 min). Cabe destacar que en la obtención de la variante del Fg $\gamma A/\gamma'$ por FPLC, la cadena $A\alpha$ se degrada fácilmente durante el proceso de purificación, por lo que es indispensable añadir aprotinina (inhibidor de serino proteasas como la plasmina) a todas las soluciones a emplear. Gorkun *et al.* [39] han indicado que cierto grado de degradación de la cadena $A\alpha$ es común en el Fg obtenido a partir de plasma. Con el fin de obtener resultados óptimos, dos componentes del sistema de separación son de especial importancia: el material de la resina y la clase de columna, ya que solo algunos tipos de material son adecuados para la separación de moléculas de proteínas [36] y el sistema disolvente o tampón que tiene que ser cuidadosamente adaptado a cada separación de una proteína específica [33]. El Fg que contiene la cadena $\gamma A/\gamma'$ es un heterodímero, con una estequiometría ($A\alpha B\beta\gamma$)-($A\alpha B\beta\gamma'$) y se conoce como Fg $\gamma A/\gamma'$ o pico 2 del Fg [8], mientras que la molécula de Fg del pico 1 es homodimérica (Fg $\gamma A/\gamma A$).

Algunos estudios han indicado que la cadena γ' [8, 40] posee una mayor carga negativa que la cadena γA [5] y contiene dos tirosinas sulfatadas y algunos residuos de ácido aspártico y glutámico. Por consiguiente la cadena $\gamma A/\gamma'$ es de mayor longitud y contiene más grupos aniónicos que la cadena γA , pudiéndose separar las dos poblaciones de Fg por cromatografía de intercambio aniónico.

La concentración promedio del pico 2 fue de $0,25 \pm 0,05$ g/L. Este resultado es similar al reportado por Finlayson *et al.* [38], quienes obtuvieron concentraciones de proteínas relativamente bajas, al utilizar un procedimiento que requiere de mayor tiempo y cantidad de reactivos, debido a que los picos obtenidos deben ser purificados nuevamente. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la concentración de los picos 1 y 2 en cada método de purificación del Fg γ' puede estar asociado al tamaño y al volumen de muestra inyectado a la columna [41].

Las ventajas del procedimiento de FPLC para la separación de las dos variantes de la cadena γ de la Fg son evidentes: cantidades menores de muestra pueden ser fraccionadas cuantitativamente en componentes puros y los tiempos de separación son considerablemente más cortos. La forma de obtención del Fg $\gamma A/\gamma'$, además de reducir los tiempos de la purificación, reduce los costos, debido a que la técnica de FPLC es un método de purificación rápido y de alta sensibilidad y precisión en comparación con los métodos clásicos de separación. Esta técnica será de mucha utilidad para futuras investigaciones relacionadas con una obtención rápida de Fg $\gamma A/\gamma'$, tema de interés por su implicación como factor de riesgo trombotico [42, 43].

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que la técnica utilizada para la purificación de las variantes del Fg, correspondiente al Fg $\gamma A/\gamma A$ (pico 1) y Fg $\gamma A/\gamma'$ (pico 2), resultó ser un método eficiente, para la purificación de la variante de Fg $\gamma A/\gamma'$ en el pico 2, debido a las ventajas que ofrece en comparación con los métodos de purificación anteriormente estudiados. Se demostró, adicionalmente, que el pico 1 no estaba contaminado con γ' . La purificación y la cuantificación de Fg $\gamma A/\gamma'$ en plasma por medio de las técnicas de FPLC y ELISA es de gran utilidad para futuros estudios de esta variante en plasma.

Referencias

- [1] I. J. Mackie, S. Kitchen, S. J. Machin, and G. Lowe, "Guidelines on fibrinogen assays," *British journal of haematology*, vol. 121, pp. 396-404, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04256.x>.
- [2] D. Meh, K. Siebenlist, S. Brennan, T. Holyst, and M. Mosesson, "The amino acid sequence in fibrin responsible for high affinity thrombin binding," *Thromb Haemost*, vol. 85, pp. 470-474, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0037-1615607>.
- [3] J. Weisel and R. Litvinov, "Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications," *Blood*, vol. 121, pp. 1712-1719, 2013 DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-306639>.
- [4] D. Chung and E. Davie, "gamma and gamma' chains of human fibrinogen are produced by alternative mRNA processing," *Biochemistry*, vol. 23, pp. 4232-4236, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi00313a033>.
- [5] C. W. Francis and V. J. Marder, "Heterogeneity of normal human fibrinogen due to two high molecular weight variant γ chains," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 408, pp. 118-120, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1983.tb23239.x>.

- [6] R. Lovely, M. Moaddel, and D. Farrell, "Fibrinogen γ' chain binds thrombin exosite II," *J Thromb Haemost.*, vol. 1, pp. 124-131, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00027.x>.
- [7] C. Wolfenstein-Todel and M. Mosesson, "Carboxy-terminal amino acid sequence of a human fibrinogen. gamma - chain variant (gamma')," *Biochemistry*, vol. 20, pp. 6146-6149, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi00524a036>.
- [8] C. Wolfenstein-Todel and M. Mosesson, "Human plasma fibrinogen heterogeneity: evidence for an extended carboxyl-terminal sequence in a normal gamma chain variant (gamma')," *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 77, pp. 5069 - 5073, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.77.9.5069>.
- [9] M. Mosesson and J. Finlayson, "Biochemical and chromatographic studies of certain activities associated with human fibrinogen preparations," *J Clin Invest*, vol. 42, pp. 747-755, 1963. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci104767>.
- [10] A. Undas and R. Ariens, "Fibrin clotstructure and function a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 31, pp. 88-99, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1161/atvbaha.111.230631>.
- [11] M. Mannila, R. Lovely, S. Kazmierczak, P. Eriksson, A. Samnegard, D. Farrell, A. Hamsten, and A. Silveira, "Elevated plasma fibrinogen γ' concentration is associated with myocardial infarction: effects of variation in fibrinogen genes and environmental factors," *J Thromb Haemost*, vol. 5, pp. 766-773, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02406.x>.
- [12] R. Lovely, L. Falls, H. Al-Mondhiry, C. Chambers, G. Sexton, H. Ni, and D. Farrell, "Association of $\gamma A/\gamma'$ fibrinogen levels and coronary artery disease," *Thromb Haemost*, vol. 88, pp. 26-31, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0037-1613148>.
- [13] E. Cheung, S. de Willige, H. Vos, F. Leebeek, D. Dippel, R. Bertina, and M. de Maat, "Fibrinogen γ' in Ischemic Stroke A Case-Control Study," *Stroke*, vol. 39, pp. 1033-1035, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.495499>.
- [14] A. Cooper, K. Standeven, and R. Ariens, "Fibrinogen gamma-chain splice variant γ alters fibrin formation and structure," *Blood*, vol. 102, pp. 535-540, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3150>.
- [15] A. Wolberg, "Primed to understand fibrinogen in cardiovascular disease," *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, vol. 36, pp. 4-6, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1161/atvbaha.115.306754>.
- [16] E. Jakobsen and P. Kierulf, "A modified beta-alanine precipitation procedure to prepare fibrinogen free of antithrombin-III and plasminogen," *Thromb. Res.*, vol. 3, pp. 145-159, 1973. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(73\)90065-0](https://doi.org/10.1016/0049-3848(73)90065-0).
- [17] D. Deutsch and E. Mertz, "Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography," *Science*, vol. 170, pp. 1095-1096, 1970. DOI: <http://doi.org/10.1126/science.170.3962.1095>.
- [18] R. Dellenback and S. Chien, "The extinction coefficient of fibrinogen from man, dog, elephant, sheep, and goat at 280 $\mu\mu$," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 134, pp. 353-355, 1970. DOI: <https://doi.org/10.3181/00379727-134-34792>.
- [19] O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr, and R. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *J Biol Chem*, vol. 193, pp. 265-275, 1951.
- [20] B. Blombäck and M. Blombäck "Purification of human and bovine fibrinogen," *Arch Chem*, vol. 10, pp. 415-443, 1956. DOI: <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.10-0147>.
- [21] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *nature*, vol. 227, pp. 680-685, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [22] R. Lovely, S. Kazmierczak, J. Massaro, R. D'Agostino, C. O'Donnell, and D. Farrell, " γ' fibrinogen: evaluation of a new assay for study of associations with cardiovascular disease," *Clin Chem.*, vol. 56, pp. 781-788, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.138347>.
- [23] D. Farrell, "Pathophysiologic roles of the fibrinogen gamma chain," *Curr. Opin. Hematol*, vol. 11, pp. 151-155, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.moh.0000131440.02397.a4>.
- [24] S. Uitte de Willige, K. F. Standeven, H. Philippou, and R. A. S. Ariens., "The pleiotropic role of the fibrinogen γ' chain in hemostasis," *Blood*, vol. 114, pp. 3994-4001, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-217968>.
- [25] A. Henschen, F. Lottspeich, M. Kehl, and C. Southan, "Covalent structure of fibrinogen," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 408, pp. 28-43, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1983.tb23232.x>.
- [26] J. Collet, Y. Allali, C. Lesty, M. Tanguy, J. Silvain, A. Ankri, B. Blanchet, R. Dumaine, J. Gianetti, L. Payot, J. W. Weisel and G. Montalescot, "Altered fibrin architecture is associated with hypofibrinolysis and premature coronary atherothrombosis," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 26, pp. 2567-2573, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000241589.52950.4c>.
- [27] E. Cheung, H. Vos, M. Kruip, H. den Hertog, J. Jukema, and M. de Maat, "Elevated fibrinogen gamma' ratio is associated with cardiovascular diseases and acute phase reaction but not with clinical outcome," *Blood*, vol. 114, pp. 4603-4604, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-236240>.
- [28] D. Meh, K. Siebenlist, and M. Mosesson, "Identification and characterization of the thrombin binding sites on fibrin," *J Biol Chem*, vol. 271, pp. 23121-23125, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.38.23121>.
- [29] M. Moaddel, D. Farrell, M. Daugherty, and M. Fried, "Interactions of Human Fibrinogens with Factor XIII: Roles of Calcium and the γ' Peptide," *Biochemistry*, vol. 39, pp. 6698-6705, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi000098u>.
- [30] K. Siebenlist, D. Meh, and M. Mosesson, "Plasma factor XIII binds specifically to fibrinogen molecules containing γ' chains," *Biochemistry*, vol. 35, pp. 10448-10453, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi9606206>.
- [31] M. Kazama, J. McDonagh, R. Wagner, R. Langdell, and R. McDonagh, "Purification and immunochemical characterization of human plasma factor XIII," *Haemostasis*, vol. 5, pp. 329-340, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1159/000214153>.
- [32] K. Gersh, and S. Lord, " An Investigation of Factor XIII Binding to Recombinant γ'/γ' and γ/γ' Fibrinogen," *Blood*, vol. 108, pp. 1705- 1706, 2006.
- [33] H. Bennett, C. Browne, and S. Solomon, "The use of perfluorinated carboxylic acids in the reversed-phase HPLC of peptides," *Journal of Liquid Chromatography*, vol. 3, pp. 1353-1365, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1080/01483918008062781>.
- [34] M. Van der Rest, H. Bennett, S. Solomon, and F. Glorieux, "Separation of collagen cyanogen bromide-derived peptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography," *Biochemical Journal*, vol. 191, pp. 253-256, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj1910253>.

- [35] R. V. Lewis, A. Fallon, S. Stein, K. D. Gibson, and S. Udenfriend, "Supports for reverse-phase high-performance liquid chromatography of large proteins" *Analytical biochemistry*, vol. 104, pp. 153-159, 1980. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90291-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90291-2).
- [36] J. D. Pearson, N. T. Lin, and F. E. Regnier, "The importance of silica type for reverse-phase protein separations" *Analytical biochemistry*, vol. 124, pp. 217-230, 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90240-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90240-8).
- [37] W. C. Mahoney and M. A. Hermodson, "Separation of large denatured peptides by reverse phase high performance liquid chromatography. Trifluoroacetic acid as a peptide solvent" *Journal of Biological Chemistry*, vol. 255, pp. 11199-11203, 1980.
- [38] J. Finlayson and M. Mosesson, "Heterogeneity of Human Fibrinogen" *Biochemistry*, vol. 2, pp. 42-46, 1963. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi00901a010>.
- [39] O. Gorkun, Y. Veklich, J. Weisel, and S. Lord, "The conversion of fibrinogen to fibrin: recombinant fibrinogen typifies plasma fibrinogen" *Blood*, vol. 89, pp. 4407-4414, 1997.
- [40] D. Farrell, E. Mulvihill, S. Huang, D. Chung, and E. Davie, "Recombinant human fibrinogen and sulfation of the gamma chain" *Biochemistry*, vol. 30, pp. 9414-9420, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi00103a004>.
- [41] M. Mosesson, J. Finlayson, R. Umfleet, and D. Galanakis, "Human Fibrinogen Heterogeneities" *J. Biol. Chem*, vol. 247, pp. 5210-5219, 1972.
- [42] L. Falls and D. Farrell, "Resistance of $\gamma A/\gamma'$ Fibrin Clots to Fibrinolysis" *J Biol Chem*, vol. 272, pp. 14251-14256, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.14251>.
- [43] F. Macrae, M. Domingues, A. Casini, and R. Ariens, "The (Patho) physiology of Fibrinogen γ " in *Semin Thromb Hemost*, vol. 42, pp. 344-355, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0036-1572353>.

Article citation:

M. E. Cantero-Guevara, B. Cardinali & R. Marchi. "Purificación del fibrinógeno gamma A/gamma prima ($\gamma A/\gamma'$) por cromatografía líquida rápida de proteínas" *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 47, no. 3, pp. 24-30, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v47n3.68891>.

Adsorción-desorción de diurón y ametrina en suelos de Colombia y España

Resumen

Aunque en la actualidad existe una gran preocupación por la contaminación y los posibles efectos sobre la salud que genera el uso frecuente de herbicidas, los estudios ambientales en los países tropicales son escasos, especialmente en Colombia. Por tanto, en el presente trabajo se evaluó la adsorción-desorción de diurón y ametrina en un suelo de Colombia (SC) y de España (SE). Los ensayos de adsorción-desorción se realizaron con moléculas de los herbicidas marcados con ¹⁴C, empleando la técnica *batch equilibrium*. En ambos suelos y para ambos herbicidas hubo un buen ajuste a las isothermas de Freundlich con R² mayores a 0,99. Para diurón, en SE ($K_{fo} = 12,82 \pm 1,23$) hubo mayor poder de adsorción frente a SC ($4,56 \pm 0,26$). Por el contrario, para la ametrina se encontró un valor de $K_{fo} = 6,47 \pm 0,25$ en SC y de $3,05 \pm 0,08$ en SE, mostrando mayor interacción con SC en comparación con SE. Para diurón se observó un grado de histéresis mayor en SC y para ametrina en SE, mostrando que la interacción de los dos herbicidas con los componentes de cada suelo es diferente dependiendo de su constitución mineralógica y su valor de pH.

Palabras clave: herbicidas; retención; zonas tropicales; zonas templadas; batch equilibrium.

Adsorption-desorption of diuron and ametryn in Colombian and Spanish soils

Abstract

Although there is currently a great concern about pollution and the possible effects on health generated by the frequent use of herbicides, environmental studies in tropical countries are scarce, especially in Colombia. Therefore, in the present study, the adsorption-desorption of diuron and ametryn was evaluated in Colombian (SC) and Spanish soils (SE). The adsorption-desorption tests were carried out with molecules of ¹⁴C radiolabeled herbicides, using the batch equilibrium technique. In both soils and for both herbicides there was a good fit to the Freundlich isotherms with R² greater than 0.99. For diuron, in SE ($K_{fo} = 12.82 \pm 1.23$) showed greater adsorption affinity than SC soil (4.56 ± 0.26). In contrast, for ametryn we found K_{fo} values of $= 6.47 \pm 0.25$ in SC and 3.05 ± 0.08 in SE, showing greater interaction with SC compared to SE. For diuron, a higher degree of hysteresis was observed in SC and for ametryn in SE, showing that the interaction of the two herbicides with the soil components is different depending on their mineralogical constitution and their pH value.

Keywords: herbicides; retention; tropical zones; temperate zones; batch equilibrium.

Adsorção-desorção de diuron e ametrina nos solos da Colômbia e da Espanha

Resumo

Na atualidade, existe uma grande preocupação acerca da poluição e dos possíveis efeitos sobre a saúde gerados pelo uso freqüente de herbicidas. Além disso, os estudos ambientais em países tropicais são escassos, especialmente na Colômbia. No presente estudo, a adsorção-desorção de diuron e ametrina foi avaliada em solo colombiano (SC) e solo espanhol (SE). Os testes de adsorção-desorção foram realizados com moléculas de herbicidas marcados com ¹⁴C, utilizando a técnica *batch equilibrium*. Em ambos os solos e para os dois herbicidas houve um bom ajuste para as isothermas de Freundlich com R² maior do que 0,99. Para o diuron, em SE ($K_{fo} = 12,82 \pm 1,23$) houve maior poder de adsorção contra SC ($4,56 \pm 0,26$). Em contraste, para a ametrina encontraram-se valores de K_{fo} de $= 6,47 \pm 0,25$ em SC e $3,05 \pm 0,08$ em SE, mostrando a maior interação com SC quando se compara com SE. Para diuron, observou-se maior grau de histerese em SC e ametrina em SE, o que mostra que as interações destes dois herbicidas com os componentes de cada solo são diferentes dependendo da sua constituição mineralógica e seu valor de pH.

Palavras-chave: herbicidas; retenção; zonas tropicais; zonas temperadas; batch equilibrium.

Introducción

El uso de los herbicidas ha aumentado de manera importante durante las últimas décadas y, a pesar de los beneficios que proporcionan para la agricultura, estas sustancias tienen la capacidad inherente de provocar efectos adversos en los seres vivos, debido a la toxicidad de estos compuestos al igual que con su persistencia en el ambiente [1, 2]. Son muchas las investigaciones que se han centrado en el destino ambiental de plaguicidas, pero pocas de ellas en suelos tropicales. Aunque existen bases de datos para el análisis del riesgo del uso de plaguicidas, una de las más usadas (PPDB) [3] contiene datos de destino ambiental realizados en países europeos y USA [4] principalmente. Algunos autores muestran que los datos de este tipo de suelos no son directamente extrapolables a las zonas tropicales y que es necesario alimentar estas bases de datos con investigaciones en este tipo de suelos [5].

La retención es uno de los procesos clave que afectan el destino de los plaguicidas en el medio suelo-agua y puede producirse tanto en la matriz del suelo por adsorción, como en los organismos por absorción (plantas y microorganismos) [6]. La adsorción depende de las características físico-químicas propias del xenobiótico y de las propiedades del suelo (contenido de arcilla y materia orgánica, composición mineral y pH fundamentalmente). Los constituyentes del suelo que presentan mayor capacidad de adsorción son los compuestos minerales y la materia orgánica. Es difícil separar claramente su participación debido a que a menudo están muy asociados [7-9]. La importancia de identificar los procesos de adsorción de los herbicidas radica en la posibilidad de predecir la manera en la que se dispersarán en el ambiente ya que afectan a otros fenómenos como la lixiviación, volatilización y degradación. Las diferencias climáticas de las regiones tropicales y las zonas templadas inciden en la composición biológica, mineral y orgánica de los suelos, por lo que es de esperar que la interacción de los herbicidas sea diferente en ambas latitudes y que, como consecuencia, los fenómenos de destino ambiental en países tropicales sean poco conocidos [10].

Ahora bien, el diurón (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) es un herbicida derivado de la urea que se usa frecuentemente en pre y postemergencia para controlar una amplia variedad de malezas anuales y perennes de hoja ancha en cultivos de caña de azúcar, algodón, café, palma aceitera, piña, cítricos y plátano. Este herbicida tiene la capacidad de inhibir la reacción de Hill, bloqueando el transporte de electrones e inhibiendo con ello la fotosíntesis (fotosistema II) [11]. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) lo ha clasificado como probable carcinógeno con base en estudios toxicológicos en ratas [12]. La adsorción de diurón está positivamente correlacionada con el contenido en materia orgánica y arcillas [13,14]. Esta molécula que puede entrar en los ecosistemas de agua dulce por escurrimiento y lixiviación ha evidenciado riesgos potenciales para varios organismos acuáticos [15]. El diurón es relativamente estable en agua, no fotosensible y persistente en suelo [16-18], por lo cual la contaminación de aguas subterráneas y superficiales se considera un grave problema [19-22].

Por su parte, la ametrina (2-etilamino-4-isopropilamino-6-metilto-1,3,5-triazina) es un herbicida de la familia de las s-triazinas que se absorbe por las raíces y las hojas de las plantas y se caracteriza por ser un inhibidor de la fotosíntesis, bloqueando el transporte de electrones [23, 24]. Se emplea en cultivos de piña, soja, maíz, algodón, caña de azúcar o plátano, olivar, vid, entre otros. Dentro del grupo de la triazinas, es la que se adsorbe más fuertemente a los componentes del suelo. Aunque se ha prohibido el uso de estos plaguicidas en la Unión Europea [25], debido a los efectos adversos estudiados en los herbicidas de la familia de las s-triazinas en organismos vivos, sigue siendo usado en Colombia. En suelos puertorriqueños, la adsorción de ametrina mostró una correlación positiva con el contenido de materia orgánica y negativa con el valor de pH [26, 27].

Teniendo en cuenta lo anterior, el propósito principal de este estudio es comparar los procesos de adsorción-desorción de diurón y ametrina en un suelo de Colombia (SC, zona tropical) y un suelo de España (SE, zona templada), de manera que se puedan evaluar las posibles diferencias y, con esto, contribuir a la información sobre el riesgo de su uso asociado a las condiciones propias del país y de las zonas tropicales en general.

Materiales y métodos

Herbicidas

Los ensayos se realizaron con moléculas marcadas y no marcadas. Diurón y ametrina técnica (99% pureza) fueron adquiridas en Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania). Diurón [ring-U-¹⁴C] (99% pureza radioquímica; actividad específica 10 mCi mmol⁻¹) fue adquirido en Institute of Isotopes CO. LTD. Budapest, Hungría y ametrina, [Ametryne ring-¹⁴C] (99% pureza radioquímica; actividad específica 10 mCi mmol⁻¹) fue adquirida en la empresa Moravek Inc., Brea, USA. En la Tabla 1 se presentan algunas de sus propiedades más relevantes frente al destino ambiental.

Suelos

Se emplearon dos diferentes suelos en el estudio: uno de zona Tropical, SC, colectado por el Centro de Investigación La Libertad (coordenadas 4° 03' 57,2" N y 73° 27' 41,7" W) de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), situada en Kilómetro 17, Vía Puerto López, Meta, Colombia, donde se cultiva piña.

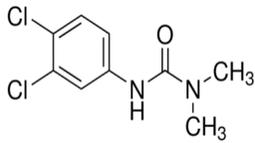
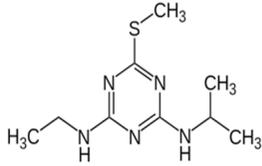
El otro suelo, SE, pertenece a un cultivo de olivar situado en la Finca El Espino (coordenadas 37° 46' 50,6" N y 3° 44' 54,1" W), carril n° 1, Puente Nuevo, Jaén, (España). Ambos suelos se muestrearon a 20 cm de profundidad empleando un barreno. Se tomaron 20 submuestras de suelo que se mezclaron para obtener una muestra compuesta de aproximadamente 2 kg. Una vez los suelos se llevaron al laboratorio de Química Agrícola de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, se dejaron secar al aire por 24 h y se pasaron por un tamiz de 2 mm. Posteriormente, fueron almacenados a temperatura ambiente hasta el momento de los análisis.

Para la determinación de pH, textura, Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC), Carbono Orgánico (CO) y densidad aparente se siguieron las metodologías propuestas por el Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC) [28]. La evaluación mineralógica de los suelos (semicuantitativa) se realizó por Difracción de rayos X en el Laboratorio de Suelos del IGAC (Tabla 2).

Cinéticas de adsorción

Para evaluar las cinéticas de adsorción de diurón se preparó una solución de diurón técnico 0,590 mg L⁻¹ y diurón [Ring-U-¹⁴C] (132,035 Bq mL⁻¹). En el caso de ametrina, se preparó una solución de ametrina técnica 0,739 mg L⁻¹ (calculada a partir de la dosis normal de campo de ametrina y ametrina radiomarcada [Ametryne ring-¹⁴C] (126,594 Bq mL⁻¹). Se tomaron muestras por triplicado (2,5 g de suelo seco) y se pusieron en contacto con 5 mL de la solución en tubos de centrifuga de 30 mL de capacidad. Las muestras se agitaron durante diferentes tiempos (6, 12, 24, 30 y 52 h), para poder evaluar el tiempo en el que se alcanza el equilibrio de reparto entre la solución y el suelo a 20 ± 1 °C.

Tabla 1. Principales Propiedades de Diurón y Ametrina.

Herbicida	Estructura	Propiedades	
Diurón		Nombre químico	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
		Familia	Fenilurea
		CAS	330-54-1
		pK _a (25 °C)	No Aplica
		Presión de vapor a 25 °C (mPa)	1,15 x 10 ⁻⁰³ a ; 9,2 x 10 ⁻⁰³ b
		Ley de Henry a 25 °C (Pa m ³ mol ⁻¹)	2,00 x 10 ⁻⁰³ a ; 5,1 x 10 ⁻⁰⁵ b
		Log K _{ow}	2,87 ^a ; 2,8 ^b
		Solubilidad (mg L ⁻¹)	35,6 ^a ;42 ^b
		Kd (L Kg ⁻¹)	2,2-35,5 ^a ; 2,9-13,0 ^b
		K _{oc} L Kg ⁻¹	813 ^a ; 477 ^b
		DT ₅₀ laboratorio (días)	75,5 (20 °C) ^a ;372 ^b
Ametrina		Nombre químico	N2-ethyl-N4-isopropil-6-methylthio-1,3,5-triazina-2,4-diamina
		Familia	Triazinas
		CAS	834-12-8 ^a
		pK _a (25°C)	4,01 ^b
		Presión de vapor a 25 °C (mPa)	0,365 ^a ;0,364 ^b
		Ley de Henry a 25 °C (Pa m ³ mol ⁻¹)	4,14 x10 ⁻⁴ a,b
		Log K _{ow}	2,63 ^{a,b}
		Solubilidad (mg L ⁻¹)	200 ^{a,b}
		Kd (L Kg ⁻¹)	0,57-47,6 ^a ;1,1-26,2 ^b
		K _{oc} (L Kg ⁻¹)	316 ^{a,b}
		DT ₅₀ laboratorio (días)	60 (20 °C) ^a ; 37 ^b

^aDatos obtenidos de PPDB [3]. ^bDatos obtenidos de ARS Pesticide Properties – USDA [4].

Para cada tiempo de medida y después de centrifugar a 3000 rpm, se tomaron sobrenadantes de 20 µL a los que se les añadieron 5 mL de coctel de centelleo Ultima Gold™ en viales pico glass. Las muestras fueron llevadas al contador de Centelleo Líquido Perkin Elmer Tri-Carb 2100TR. Las cantidades de cada herbicida adsorbido en suelo se calcularon a partir de la diferencia entre la concentración inicial del herbicida en la solución y las concentraciones del sobrenadante para cada tiempo de análisis. Los cálculos de las soluciones se realizaron a partir de las dosis normales de campo de ambos herbicidas (diurón: 3 L ha⁻¹, 80% i.a.; ametrina: 5 L ha⁻¹, 50% i.a.) y teniendo en cuenta una profundidad de 20 cm y la densidad aparente promedio de los suelos.

Isotermas de adsorción-desorción

Para la obtención de las isotermas se empleó la técnica *batch equilibrium*. Para ello prepararon soluciones de ambos herbicidas a 5 concentraciones diferentes: Para diurón D/3=0,196, D/2=0,295, D=0,590, 2D=1,180 y 3D=1,770 mg L⁻¹; para ametrina D/3=0,246, D/2=0,369, D=0,739, 2D=1,447 y 3D=2,220 mg L⁻¹, siendo D el equivalente a la dosis normal de campo de cada herbicida. A cada concentración se le añadió además el herbicida radiomarcado: para diurón [Ring-U-¹⁴C] 122,616 Bq mL⁻¹ y para ametrina [Ametryne ring-¹⁴C] 229,25 Bq mL⁻¹. Todas las soluciones se prepararon con CaCl₂ 0,01 M.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas y mineralógicas de los suelos evaluados.

		Suelo Colombia (SC)	Suelo España (SE)
pH		4,5	8
CIC (cmol⁺ Kg⁻¹)		6	17,7
CO (%)		0,9	1,1
ρ_b (g cm⁻³)		1,36	1,01
Textura	Arcilla (%)	14,4	40,5
	Limo (%)	44,1	42,2
	Arena (%)	41,5	15,5
	Clase	Franco	Arcilloso Limoso
Constitución mineralógica de las Arcillas	Cloritas (%)	3,9	-
	Micas (%)	40,2	14,6
	Pirofilita (%)	2,6	-
	Caolinita (%)	19,5	9,1
	Lepidocrocita (%)	<1%	-
	Cuarzo (%)	23,7	17,5
	Feldespatos (%)	4,5	2,2
	Calcita (%)	2,4	50,3
	Dolomita (%)	1,4	<1%
	Interstratificados (%)	-	<1%
	Montmorillonita (%)	-	4,7
	Hematita (%)	-	<1%

Textura: método de Bouyoucos; **pH:** relación suelo: agua 1: 2; **CIC.** (capacidad de intercambio catiónico) por el método de acetato de amonio 1M a pH = 7; **CO** (Carbono Orgánico) por el método Walkley-Black; **ρ_b** (densidad aparente) por el método del terrón parafinado.

Se incluyeron muestras blanco (sin suelos) para evaluar la posible adsorción de los herbicidas sobre la superficie de las paredes de los tubos de centrifuga para ser tenidas en cuenta en los cálculos. Debido a los altos tiempos de vida media de ambas moléculas (Tabla 1), se considera que no hay degradación durante la duración de los experimentos.

Por cada suelo y concentración de las soluciones preparadas, se pesaron 5 g de suelo (peso seco) a los que se les añadieron 10 mL de solución en tubos de centrifuga de 30 mL de capacidad (ensayos por triplicado). Posteriormente, se agitaron los tubos por un periodo de 24 h a 20 ± 2 °C y oscuridad. Por último, se centrifugaron por 15 min a 3000 rpm a 20 ± 2 °C. Se tomaron alícuotas de 0,5 mL del sobrenadante y se midieron en contador de centelleo después de la adición de 5 mL de cóctel de centelleo. La cantidad de la molécula marcada radiactivamente adsorbida por el suelo se calculó a partir la diferencia entre la concentración inicial del herbicida en solución y la concentración en equilibrio.

Las isothermas de adsorción vienen descritas por la ecuación de Freundlich (1):

$$Q_{ads} = K_{fa} C_{eq}^{na} \quad (1)$$

En donde, Q_{ads} es la cantidad adsorbida en la fase sólida (mg kg⁻¹); C_{eq} es la concentración en equilibrio en la solución (mg L⁻¹); K_{fa} y na son coeficientes empíricos de la adsorción.

Se define el coeficiente de partición, K_d como la relación entre la cantidad adsorbida en la fase sólida y la concentración de la solución en el equilibrio (2):

$$K_d = Q_{ads} / C_{eq} \quad (2)$$

Este valor coincide con K_{fa} de las isothermas de Freundlich cuando $na=1$, y puede considerarse el modelo lineal.

El coeficiente K_{oc} se calcula como la relación entre K_d y el porcentaje de CO del suelo (3):

$$K_{oc} = K_d / \%CO \quad (3)$$

De manera análoga se puede plantear el $K_{arcilla}$ como la relación entre K_d y el porcentaje de arcillas del suelo (4):

$$K_{oc} = K_d / \% arcillas \quad (4)$$

La desorción de cada uno de los herbicidas se midió inmediatamente después de realizar los ensayos de adsorción. Una vez alcanzó el equilibrio de adsorción (24 h), el sobrenadante de cada tubo fue retirado y medido. Se añadieron 5 mL de solución CaCl₂ 0,01 M libre de herbicida. Se llevó a fuerte agitación mecánica para disgregar el *pellet* formado por el suelo con la ayuda de un vórtex. Los tubos se llevaron de nuevo a agitación durante 24 h a una temperatura de 20 ± 2 °C y oscuridad en agitador. Después, la solución se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm a 20 ± 2 °C. Se realizaron cuatro desorciones consecutivas para cada muestra de suelo y concentración para cada herbicida. La radiactividad en cada desorción se midió tomando una alícuota de 0,5 mL de sobrenadante y midiendo en el contador de centelleo (previa adición de 5 mL de cóctel de centelleo). La cantidad de herbicida marcado que permanece en el suelo en cada desorción se calcula a partir de la diferencia entre la cantidad inicial de herbicida adsorbido y la cantidad desorbida en cada ciclo.

Las isothermas de desorción se ajustaron también a la ecuación de Freundlich (5):

$$Q_{ads} = K_{fd} C_{eq}^{nd} \quad (5)$$

En donde, Q_{ads} es la cantidad adsorbida en la fase sólida (mg kg⁻¹); C_{eq} es la concentración en equilibrio en la solución (mg L⁻¹); K_{fd} y nd son coeficientes empíricos de la desorción.

La histéresis puede ser definida como la no coincidencia de las isothermas de adsorción y desorción y es un factor clave para la dispersión de herbicidas en el ambiente y la eficacia en la agricultura. Este parámetro normalmente está relacionado con diferentes mecanismos de unión de los herbicidas a las partículas de suelo durante los procesos de adsorción y desorción. El grado de histéresis puede ser evaluado a partir del índice de histéresis (6):

$$H = nd/na \quad (6)$$

Cuando $H=1$, no hay histéresis, aunque en la práctica se considera que valores de H comprendidos entre 0,7 y 1 muestran procesos reversibles [29].

Análisis de datos

Las gráficas y los ajustes a las isothermas de adsorción de Freundlich se realizaron empleando el programa Sigmaplot versión 12.5. Para el análisis estadístico de empleo el mismo programa y dicho análisis consistió en comparación de medias de los valores Q_{ads} mediante un test ANOVA.

Resultados y discusión

De acuerdo a las propiedades de los suelos (Tabla 2), se pueden observar algunas diferencias que son características de acuerdo al origen de cada uno. Las más notables se refieren a la textura, el pH y CIC, parámetros que son muy importantes para comprender el comportamiento de xenobióticos como diurón y ametrina ya que, como muestran algunos estudios, el comportamiento de estos herbicidas en el suelo se encuentra altamente influenciado por el pH [26, 30]. Este parámetro también se encuentra relacionado y determina por completo la CIC porque el suelo tiene sitios de intercambio que se activan a medida que aumenta el pH. Por esto en el SE que presenta un valor de pH alto; también se observa un valor de CIC elevado a diferencia SC. La CIC, a su vez, se correlaciona con el porcentaje de arcillas ya que, cuando el contenido de arcilla aumenta en el suelo, aumenta también el valor CIC [31].

Cinéticas de adsorción

En la Figura 1 se muestran las curvas experimentales de las cinéticas de adsorción para diurón y ametrina en los suelos SC y SE. En primer lugar, la adsorción es rápida en las superficies de los minerales y componentes orgánicos del suelo y, en una etapa posterior, la velocidad de adsorción disminuye a medida que se van saturando los sitios activos más externos de los suelos y las moléculas experimentan lenta difusión-inmovilización en microporos y/o materia orgánica [32, 33]. Para diurón las diferencias entre los porcentajes de adsorción a las 6 h y 24 h fueron inferiores al 2,5% en SE.

Los porcentajes de adsorción para SC fueron de 72,5% (6 h) y 78,5% (24 h), evidenciándose una mayor diferencia. Sin embargo, el incremento en el porcentaje de adsorción en el siguiente tiempo solo fue inferior al 0,5%. Para el caso ametrina en SC, entre los tiempos 24 y 30 h ya se había adsorbido aproximadamente el 90% del herbicida, mientras que, en estos mismos tiempos, en SE se había adsorbido solo el 65%. La adsorción de la triazina aumenta ligeramente de las 24 h a las 30 h y de las 30 h a las 52 h, sin embargo, las pequeñas variaciones en los porcentajes de adsorción para intervalos de tiempo tan largos (< 3%) nos permiten aproximar igualmente y por cuestiones prácticas los tiempos de equilibrio a las 24 h. Esto se puede explicar si se tiene en cuenta que estudios han demostrado que ametrina presenta una adsorción más rápida y es más frecuente en suelos ácidos frente a los que tienen alto valor de pH [8,29]. Adicionalmente, se ha señalado que el fenómeno de adsorción para triazinas como ametrina está relacionado con las propiedades hidrofóbicas de esta molécula [29]. Para tiempos superiores a 30 h no se observaron cambios apreciables en el porcentaje de adsorción en cada uno de los suelos. Estos resultados nos permiten establecer el tiempo aparente de equilibrio de 24 h para los sucesivos ensayos. Este tiempo es además el establecido en otras investigaciones para ambos herbicidas [29, 34].

Isotermas de adsorción-desorción

Los resultados muestran que la adsorción de los herbicidas es marcadamente diferente en los dos suelos (Tabla 3). Para ambos herbicidas y suelos, al aumentar la concentración, disminuyen los porcentajes de adsorción. El suelo de España muestra los valores más altos de K_d para diurón, exhibiendo una mayor adsorción.

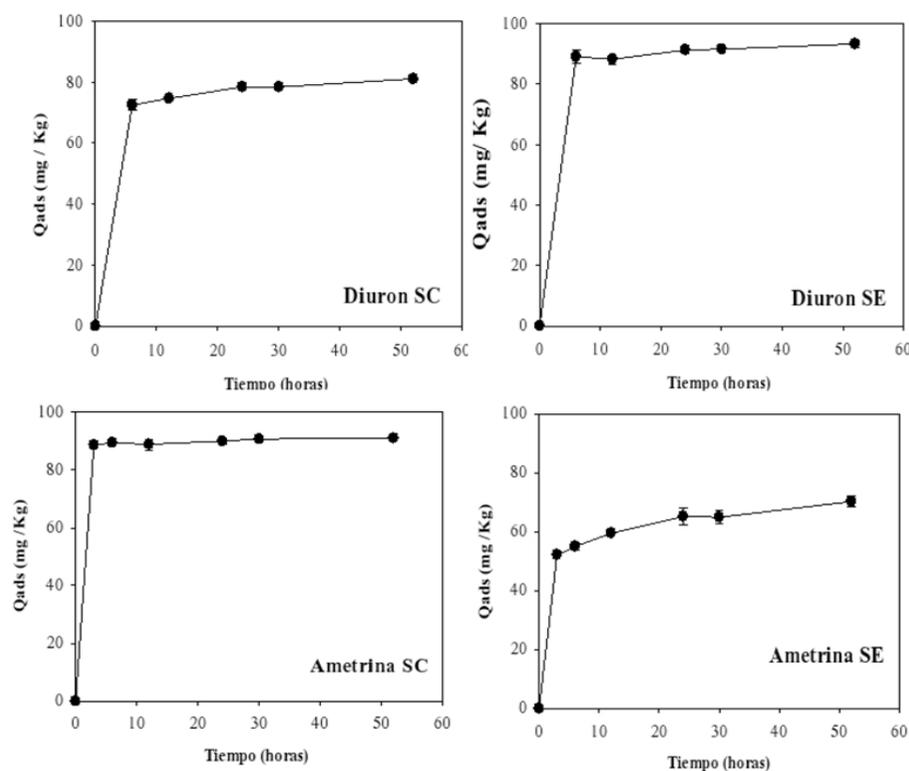


Figura 1. Cinéticas de adsorción de diurón y ametrina para los suelos de Colombia (SC) y España (SE).

Tabla 3. Resultados de las isotermas de adsorción y valores de K_d y K_{oc} para diurón y ametrina.

Suelo de Colombia (SC)					Suelo de España (SE)			
Diurón								
Dosis	adsorción %	Desorción %	k_d (L kg ⁻¹)	K_{oc} (L kg ⁻¹)	adsorción %	Desorción %	k_d (L kg ⁻¹)	K_{oc} (L kg ⁻¹)
D/3	88,1±0,5	25,1±0,8	13,8±0,7	1504 ±79	93,7±0,4	9,3±0,6	30,4±2,1	2797±188
D/2	86,4±0,8	28,2±1,4	11,9±0,5	1298 ±58	92,7±0,2	10,8±0,4	25,1±0,8	2308±70
D	84,3±1,6	33,6±1,9	10,3±0,9	1118 ±96	91,3±0,1	12,5±0,4	20,7±0,6	1903±51
2D	78,8±1,2	38,6±1,4	6,6±0,8	713 ±82	89,8±0,4	17,2±1,1	16,9±0,7	1559±60
3D	76,9±1,2	40,9±1,7	6,10±0,6	665 ± 68	89,7±0,3	15,3±0,5	17,1±0,5	1577±46
Ametrina								
D/	86,3±0,8	25,3±0,6	12,5±0,7	1363±82	67,1±0,7	58,5±2,6	4,00±0,1	368±8
D/2	84,5±0,5	28,1±0,6	10,7±0,5	1169±52	66,1±1,4	68,3±3,3	3,8±0,1	346±11
D	81,2±0,7	31,2±0,7	8,5±0,3	929±36	64,6±0,3	69,9±2,9	3,6±0,1	327±3
2D	79,8±1,7	41,6±1,3	7,5±0,5	821±53	60,1±10,1	62,4±2,2	3,0±1,4	280±130
3D	79,3±1,1	46,0±1,4	7,2±0,1	788±7	62,3±1,0	65,4±2,6	3,2±0,1	291±7

Diurón es un herbicida no ionizable, por lo que el pH de los diferentes suelos (Tabla 2) en principio no afecta directamente a su adsorción [5, 26]. Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado por otros autores que muestran la relación entre CIC y la adsorción de diurón. SE presenta un mayor valor de CIC y un contenido de MO ligeramente mayor que SC, lo que explica su mayor valor de K_d [26, 35-38].

El coeficiente K_{oc} se utiliza para normalizar el fenómeno de adsorción, independientemente del contenido de materia orgánica. Se supone que, si los compuestos orgánicos son los únicos responsables de la adsorción, este coeficiente debe ser igual para todos los suelos. En un estudio realizado en 43 suelos (tropicales y suelos templados) se encontró que solo el 58% de los datos de adsorción de diurón pueden ser explicados con base en el contenido de MO [5]. Sin embargo, cuando se encuentran valores diferentes de K_{oc} en suelos con porcentajes de CO inferiores al 2%, significa que hay otros materiales en el suelo, como el componente mineral, que están igualmente adsorbiendo el herbicida [23,40]. En el caso de SE encontramos un alto porcentaje de arcillas y la presencia de montmorillonitas, arcillas con mayor capacidad adsorbente frente a otros tipos de minerales arcillosos [41] con respecto al SC, lo que puede también explicar sus mayores valores de K_{oc} [5]. Cuando se calculan los $K_{arcilla}$ (datos no mostrados) los valores calculados para diurón son 31,66 L kg⁻¹ y 31,65 L kg⁻¹ para SC y SE respectivamente, mostrando la afinidad de estas en la adsorción del herbicida y que esta propiedad puede usarse para comparar la adsorción en suelos con bajos contenidos de materia orgánica.

Así mismo, en la Tabla 3 se muestra para diurón que, a medida que disminuye el porcentaje adsorbido, aumenta el porcentaje desorbido (suma de las cuatro desorciones consecutivas), de acuerdo a las concentraciones de las dosis analizadas de ambos herbicidas.

En el caso de ametrina, se observa un comportamiento inverso respecto a la adsorción en ambos suelos ya que, como se puede observar en la Tabla 3, su adsorción es mayor en el SC (K_d : 12,51-7,23 L kg⁻¹) frente al SE (K_d : 3,99-3,16 L kg⁻¹). A pesar de que SE contiene mayor cantidad de arcillas y mayor CIC, en este caso no parece haber una influencia del componente mineral sobre la adsorción de ametrina. El cálculo de $K_{arcilla}$ de ametrina es muy diferente para los dos suelos (44,9 L kg⁻¹ para SC y 7,5 L kg⁻¹ para SE) indicando que no puede utilizarse este componente para normalizar los valores de adsorción en diferentes suelos y que otras propiedades del suelo influyen en su afinidad por el adsorbente. Estos resultados pueden estar relacionados con parámetros como el pH, ya que en algunos estudios se ha reportado que la adsorción de compuestos derivados de las s-triazinas, como ametrina, es mayor en suelos de pH ácidos frente a suelos con altos valores de pH [8, 26, 27, 29, 43]. La ametrina es una base débil y un descenso del valor de pH genera protonación de la molécula, aumentando así sus posibilidades de interacción iónica con los componentes de SC. Además, las triazinas, incluida la ametrina, muestran poca afinidad por minerales como la calcita, que es abundante en SE, y el cuarzo [29, 44, 45], mientras que sí presentan afinidad de adsorción por la caolinita, presente en mayor proporción en SC (Tabla 2) ya que este mineral presenta cargas negativas en todo el rango de pH [46].

Estudios previos con atrazina indican que la unión del herbicida no ionizado a minerales como la caolinita es dependiente del valor de pH [44]. Además, esta tendencia ha sido igualmente encontrada por otros autores para ametrina en un estudio sobre 25 suelos de Pakistán y Australia [8] y otras triazinas con los mismos grupos básicos [47]. Los porcentajes de desorción son mayores en SE debido a su menor afinidad en este suelo, un fenómeno que podría estar asociado no sólo al efecto del pH sobre la molécula, sino también sobre el componente mineral del suelo.

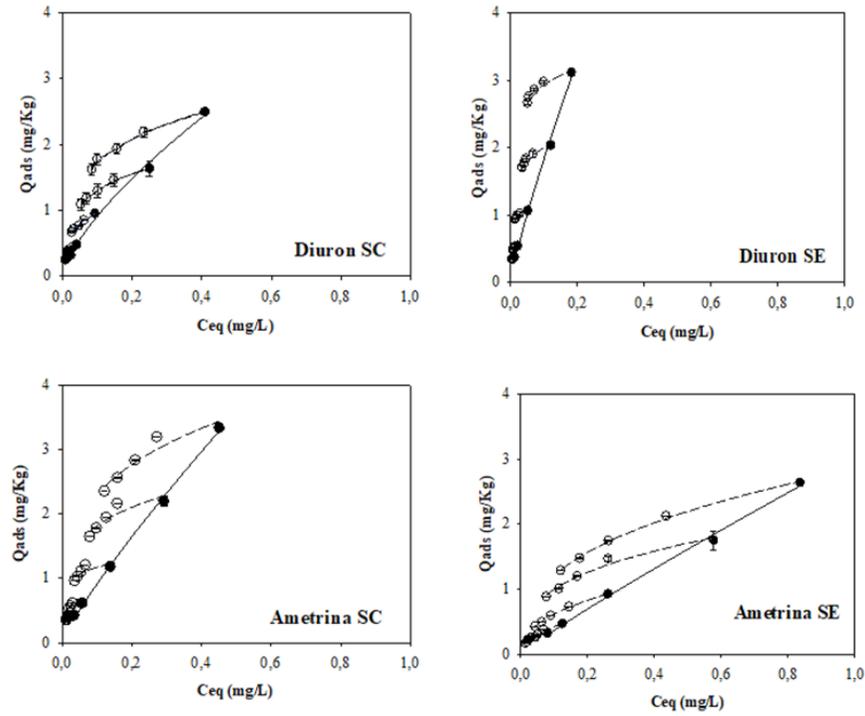


Figura 2. Isotermas de adsorción (círculos negros y línea sólida) y desorción (círculos blancos y línea punteada) de diurón y ametrina para los suelos de Colombia (SC) y España (SE).

Tabla 4. Parámetros de Freundlich para diurón y ametrina en los suelos de SE y SC.

		Suelo Colombia (SC)			Suelo España (SE)		
		K_{fa}/K_{fd}	na/nd	R^2	K_{fa}/K_{fd}	na/nd	R^2
Diurón	Adsorción	$4,56 \pm 0,26^a$	$0,69 \pm 0,04$	0,9970	$12,82 \pm 1,23^b$	$0,84 \pm 0,04$	0,9978
	Desorción D/3	$0,74 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,01$	0,9966	$0,50 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,00$	0,9858
	Desorción D/2	$1,02 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,01$	1,0000	$0,75 \pm 0,06$	$0,08 \pm 0,01$	0,9342
	Desorción D	$1,78 \pm 0,08$	$0,26 \pm 0,01$	0,9942	$1,40 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,01$	0,9775
	Desorción 2D	$2,35 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,00$	0,9980	$2,71 \pm 0,10$	$0,13 \pm 0,01$	0,9836
	Desorción 3D	$3,16 \pm 0,07$	$0,26 \pm 0,01$	0,9958	$3,79 \pm 0,14$	$0,11 \pm 0,01$	0,9730
Ametrina	Adsorción	$6,47 \pm 0,25^a$	$0,85 \pm 0,03$	0,9989	$3,05 \pm 0,08^b$	$0,91 \pm 0,04$	0,9983
	Desorción D/3	$0,71 \pm 0,17$	$0,14 \pm 0,06$	0,8095	$0,77 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,01$	0,9964
	Desorción D/2	$0,97 \pm 0,18$	$0,15 \pm 0,05$	0,8492	$1,15 \pm 0,08$	$0,43 \pm 0,02$	0,9943
	Desorción D	$1,60 \pm 0,27$	$0,13 \pm 0,06$	0,7899	$1,64 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,00$	0,9995
	Desorción 2D	$2,96 \pm 0,32$	$0,21 \pm 0,05$	0,9076	$2,14 \pm 0,09$	$0,33 \pm 0,03$	0,9876
	Desorción 3D	$4,25 \pm 0,28$	$0,26 \pm 0,04$	0,9593	$2,83 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,01$	0,9990

Valores con diferente letra (a-b) indican que las constantes de cada suelo son estadísticamente diferentes

Las isothermas de adsorción-desorción fueron empleadas para evaluar cuantitativamente las interacciones de los herbicidas con ambos suelos. Las isothermas se encuentran representadas en la Figura 2 y los parámetros del ajuste a la ecuación de Freundlich se encuentran en la Tabla 4. El ajuste a la ecuación para describir la adsorción fue bueno para ambos suelos y herbicidas con valores de R^2 superiores a 0,99 en todos los casos. Los valores de n_a inferiores a 1 muestran que no son fenómenos lineales, sino que la capacidad de adsorción disminuye a medida que aumenta la concentración (isothermas tipo L). Este resultado está de acuerdo con mayores valores de K_d (Tabla 3) para las concentraciones más pequeñas de los herbicidas.

Para diurón, el valor de n_a fue de $0,69 \pm 0,04$ mostrando la menor tendencia lineal en SC. Los valores de K_{fa} encontrados, muestran que la adsorción en el suelo SE es cuatro veces mayor que en SC, relacionado como hemos visto con su mayor contenido de arcillas, MO y la presencia de montmorillonitas. Cuando se examinan las isothermas de desorción, se obtiene igualmente un buen ajuste a la ecuación de Freundlich. Los valores de n_d varían entre 0,26-0,23, con un valor promedio de 0,25 para SC y entre 0,07-0,13 para SE con un valor promedio de 0,10. A partir de los valores promedio de los n_d obtenidos, se puede calcular el índice de histéresis $H=0,35$ para SC y $H=0,11$ para SE mostrando una gran irreversibilidad del proceso de adsorción de diurón en ambos suelos, especialmente en el suelo de España. Esto podría explicarse no solo por un mayor número de interacciones (tipo Van der Waals y puentes de hidrógeno) entre el herbicida y SE, sino por otros mecanismos de adsorción menos reversibles como la lenta difusión de la molécula entre los componentes minerales, especialmente montmorillonita presente en este suelo [32, 33] o los microporos de la materia orgánica [34].

Los valores de K_{fa} para ametrina fueron $6,47 \pm 0,25$ y $3,05 \pm 0,08$ para SC y SE respectivamente, acorde con un mayor valor de pH en SC. Cuando se evalúa la desorción, se observan valores de n_d más pequeños (promedio $n_d = 0,18$) en SC mostrando menor reversibilidad de la adsorción con $H = 0,21$ frente a un valor de $H = 0,45$ para SE. Probablemente una menor irreversibilidad puede explicarse en SE a partir de su valor de pH = 8 (Tabla 2). A este valor de pH los minerales del suelo están cargados negativamente y existirá repulsión con las moléculas de ametrina cuyo principal mecanismo de unión al suelo son las interacciones electrostáticas ($pka = 4,1$) lo que genera una repulsión entre cargas que hace más eficiente el proceso de desorción en este suelo que en SC [43]. También puede ser explicado por su alto porcentaje de calcita que tiene baja afinidad por ametrina [29, 27].

Conclusiones

Los resultados muestran que diurón se adsorbe con mayor fortaleza en el suelo de España y el suelo de Colombia es más fácilmente saturable con la molécula en el rango de concentraciones estudiadas. Al evaluar la desorción, se logró evidenciar que las interacciones en SC son más débiles y son más fácilmente removibles por las aguas de lluvia en SC. Acorde con estos resultados, el ajuste de las isothermas de Freundlich y la evaluación del fenómeno de histéresis indican un mayor riesgo de contaminación en el suelo tropical evaluado. Para ametrina, se encontró un comportamiento inverso ya que la adsorción-desorción de este herbicida está altamente influenciada por el pH del suelo, siendo más adsorbida y presentando mayor histéresis a pH ácido, lo que reduce el riesgo de lixiviación en el suelo tropical. Sin embargo, para poder concluir sobre el riesgo de contaminación es necesario evaluar también la degradación de estos compuestos, ya que esto determina también su movilidad en suelos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República por la financiación de este proyecto con código HERMES 36916 de la Universidad Nacional de Colombia.

Referencias

- [1] S. Foster, "The Ninth Ineson Lecture: Assessing and Controlling the Impacts of Agriculture on Groundwater--from Barley Barons to Beef Bans", *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology*, vol. 33, no. 4, pp. 263-280, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1144/qjegh.33.4.263>.
- [2] M. Severino and P. Silva, "Taxa de degradação de ametrina em quatro solos brasileiros: indicativo do comportamento ambiental", *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 36, no. 3, pp. 1023-1030, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-06832012000300032>.
- [3] PPDB, "Footprint agricultural substances databases: background and support information. University of Hertfordshire", Sitem.herts.ac.uk, 2018. [Online]. Available: https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/docs/5_1.pdf. [Accessed: 30- Jan- 2018].
- [4] ARS Pesticide Properties – U.S. Department of Agriculture, [Online]. Disponible en: <https://www.ars.usda.gov/ARSPUserFiles/00000000/DatabaseFiles/PesticidePropertiesDatabase/IndividualPesticideFiles/DIURON.TXT>, <https://www.ars.usda.gov/ARSPUserFiles/00000000/DatabaseFiles/PesticidePropertiesDatabase/IndividualPesticideFiles/AMETRYN.TXT>. 2018 (Consultado el 01 de febrero de 2018)
- [5] J. Liyanage, R. Watawala, A. Aravinna, L. Smith and R. Kookana, "Sorption of Carbofuran and Diuron Pesticides in 43 Tropical Soils of Sri Lanka", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 5, pp. 1784-1791, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf052021o>.
- [6] J. Beltrán, F. Hernández, I. Morell, "Estudios de Adsorción de plaguicidas en suelos mediante experiencias en Batch. Avances en la Investigación en Zona no Saturada". *Avances en la Investigación de la Zona No Saturada. Gonzalo JM and Antiguiedad I (eds)*, pp: 257-268. 1995.
- [7] R. Ahmad, R. Kookana and A. Alston, "Sorption of ametryn and imazethapyr in twenty-five soils from Pakistan and Australia" *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 36, no. 2, pp. 143-160, 2001. DOI: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/PFC-100103740>.
- [8] F. Sanchez-Bayo and R.V Hyne, "Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions". *Integrated Environmental Assessment and Management*. vol. 7, no. 4, pp. 577-586, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/ieam.189>.
- [9] D. Werner, J. Garratt and G. Pigott, "Sorption of 2,4-D and other phenoxy herbicides to soil, organic matter, and minerals", *Journal of Soils and Sediments*, vol. 13, no. 1, pp. 129-139, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11368-012-0589-7>.
- [10] S. Lewis, D. Silburn, R. Kookana and M. Shaw, "Pesticide Behavior, Fate, and Effects in the Tropics: An Overview of the Current State of Knowledge", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, no. 20, pp. 3917-3924, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01320>.

- [11] W. Ahrens and M. Edwards, *Herbicide handbook*. Champaign, Ill.: Weed Science Society of America, 1994; pp. 136.
- [12] US-EPA, US EPA Office of Pesticide Programs, Health Effects Division, Tox Oneliners, EPA chem code 035505 - Diuron. 1999 [Consultado en Marzo de 2018]
- [13] J. J. Hasset, W L. Banwart, R. A. Griffin, "Correlation of compound properties with sorption characteristics of non-polar compounds by soils and sediments: concepts and limitations" *Environment and soil wastes*, pp.:161-178. 1983
- [14] R. Calvet, "Adsorption of Organic Chemicals in Soils", *Environmental Health Perspectives*, vol. 83, p. 145, 1989. DOI: <https://doi.org/10.2307/3430653>.
- [15] D. Oliver, R. Kookana and B. Quintana, "Sorption of Pesticides in Tropical and Temperate Soils from Australia and the Philippines", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 16, pp. 6420-6425, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0502931>
- [16] K. Djebbar, A. Zertal, N. Debbache and T. Sehili, "Comparison of Diuron degradation by direct UV photolysis and advanced oxidation processes", *Journal of Environmental Management*, vol. 88, no. 4, pp. 1505-1512, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2007.07.034>.
- [17] M.H. Inoue, R. S. De Oliveira, J. Constantin, D.G. Alonso, D.C. De Santana, "Leaching potential and degradation of diuron in two soils of contrasting texture" *Acta Scientiarum-Agronomy.*, vol. 30, pp. 631-638, 2008.
- [18] Feng, Z. Zheng, J. Luan, J. Zhang and L. Wang, "Degradation of diuron in aqueous solution by ozonation", *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 43, no. 7, pp. 576-587, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1080/03601230802234450>.
- [19] A. Imache, A. Dahchour, B. Elamrani, S. Dousset, F. Pozzoni and L. Guzzella, "Leaching of Diuron, Linuron and their main metabolites in undisturbed field lysimeters", *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 44, no. 1, pp. 31-37, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1080/03601230802519579>.
- [20] Lamoree, C. Swart, A. van der Horst and B. van Hattum, "Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas and coastal waters", *Journal of Chromatography A*, vol. 970, no. 1-2, pp. 183-190, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)00878-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)00878-6).
- [21] IFEN The French Institute of the Environment, "Les pesticides dans les eaux", 6ème annuel, 2002.
- [22] UK-EPA, "Pesticides 2002: A summary of monitoring of the aquatic environment in England and Wales", Environment Agency. [online]. Available on: <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20070114093545/http://www.environment-agency.gov.uk/> [consultado el 20 de abril de 2018]
- [23] Y. El-Nahhal and N. Hamdona, "Adsorption, leaching and phytotoxicity of some herbicides as single and mixtures to some crops", *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, vol. 22, no. 1, pp. 17-25, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaubas.2016.01.001>.
- [24] Y. Liu, L. Ma, Y. Lu, S. Jiang, H. Wu and H. Yang, "Comprehensive analysis of degradation and accumulation of ametryn in soils and in wheat, maize, ryegrass and alfalfa plants", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 140, pp. 264-270, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.053>.
- [25] C. Sandoval-Carrasco, D. Ahuatzi-Chacón, J. Galíndez-Mayer, N. Ruiz-Ordaz, C. Juárez-Ramírez and F. Martínez-Jerónimo, "Biodegradation of a mixture of the herbicides ametryn, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in a compartmentalized biofilm reactor", *Bioresource Technology*, vol. 145, pp. 33-36, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.068>.
- [26] L. Liu, H. Cibes-Viadé, F. Koo, "Adsorption of Ametryne and Diuron by Soils", *Weed Science*, vol. 18(4), pp. 470-474. 1970. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0043174500078474>.
- [27] Szewczyk, A. Kuśmierska and P. Bernat, "Ametryn removal by *Metarhizium brunneum*: Biodegradation pathway proposal and metabolic background revealed", *Chemosphere*, vol. 190, pp. 174-183, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.011>.
- [28] Departamento Nacional de Estadística & Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC), *Métodos analíticos del Laboratorio de Suelos*. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia. 2006.
- [29] S. Stipičević, L. Sekovanić and V. Drevenkar, "Ability of natural, acid-activated, and surfactant-modified Terra Rossa soils to sorb triazine herbicides and their degradation products", *Applied Clay Science*, vol. 88-89, pp. 56-62, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.12.017>.
- [30] P. Rocha, A. Faria, G. Silva, M. Queiroz, F. Guimarães, S. Tironi, L. Galon and A. Silva, "Meia-vida do diuron em solos com diferentes atributos físicos e químicos", *Ciência Rural*, vol. 43, no. 11, pp. 1961-1966, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0103-84782013001100007>.
- [31] Jaramillo, D, *Introducción a la Ciencia del suelo*. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. pp. 322; 2002.
- [32] Pignatello and B. Xing, "Mechanisms of Slow Sorption of Organic Chemicals to Natural Particles", *Environmental Science & Technology*, vol. 30, no. 1, pp. 1-11, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1021/es940683g>.
- [33] L. de Jonge, H. de Jonge, P. Moldrup, O. Jacobsen and B. Christensen, "Sorption of Prochloraz on Primary Soil Organomineral Size Separates", *Journal of Environment Quality*, vol. 29, no. 1, p. 206, 2000. DOI: <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900010026x>.
- [34] X. Yu, G. Ying and R. Kookana, "Sorption and Desorption Behaviors of Diuron in Soils Amended with Charcoal", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 22, pp. 8545-8550, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf061354y>.
- [35] Smernik and R. Kookana, "The effects of organic matter-mineral interactions and organic matter chemistry on diuron sorption across a diverse range of soils", *Chemosphere*, vol. 119, pp. 99-104, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.066>.
- [36] A. Ahangar, R. Smernik, R. Kookana and D. Chittleborough, "Clear effects of soil organic matter chemistry, as determined by NMR spectroscopy, on the sorption of diuron", *Chemosphere*, vol. 70, no. 7, pp. 1153-1160, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2495/etox080341>.
- [37] R. Schwarzenbach, P. Gschwend and D. Imboden, *Environmental organic chemistry*. New York: Wiley-Interscience, pp. 1401-1409, 1993.
- [38] Y. Gao, W. Xiong, W. Ling, X. Wang and Q. Li, "Impact of exotic and inherent dissolved organic matter on sorption of phenanthrene by soils", *Journal of Hazardous Materials*, vol. 140, no. 1-2, pp. 138-144, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.053>.
- [39] J. Regitano, F. Prata, N. Dias, A. Lavorenti and V. Tornisielo, "Sorção-desorção do fungicida clorotalonil em solos com diferentes teores de matéria orgânica", *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 26, no. 1, pp. 267-274, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-06832002000100028>.

[40] M. Rubio-Bellido, E. Morillo and J. Villaverde, "Effect of addition of HPBCD on diuron adsorption-desorption, transport and mineralization in soils with different properties", *Geoderma*, vol. 265, pp. 196-203, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.11.022>.

[41] N. P. Qafoku, E. Van Ranst, A. Noble, G. Baert, "Variable charge soils: their mineralogy, chemistry and management", *Advances in Agronomy*, vol. 84, pp. 159-215, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(04\)84004-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(04)84004-5).

[42] A. Cabrera, L. Cox, P. Velarde, W. Koskinen and J. Cornejo, "Fate of diuron and terbuthylazine in soils amended with two-phase olive oil mill waste", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 12, pp. 4828-4834, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf070525b>.

[43] S. Shattar, N. Zakaria and K. Foo, "Utilization of montmorillonite as a refining solution for the treatment of ametryn, a second generation of pesticide", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 5, no. 4, pp. 3235-3242, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.06.031>.

[44] L. Clausen, I. Fabricius and L. Madsen, "Adsorption of Pesticides onto Quartz, Calcite, Kaolinite, and α -Alumina", *Journal of Environment Quality*, vol. 30, no. 3, p. 846, 2001. DOI: <https://doi.org/10.2134/jeq2001.303846x>.

[45] G. Kasozi, P. Nkedi-Kizza, Y. Li and A. Zimmerman, "Sorption of atrazine and ametryn by carbonatic and non-carbonatic soils of varied origin", *Environmental Pollution*, vol. 169, pp. 12-19, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.05.002>.

[46] L. Cáceres-Jensen, J. Rodríguez-Becerra, J. Parra-Rivero, M. Escudey, L. Barrientos and V. Castro-Castillo, "Sorption kinetics of diuron on volcanic ash derived soils", *Journal of Hazardous Materials*, vol. 261, pp. 602-613, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.073>.

[47] C. Seybold, K. McSweeney and B. Lowery, "Atrazine Adsorption in Sandy Soils of Wisconsin", *Journal of Environment Quality*, vol. 23, no. 6, p. 1291, 1994. DOI: <https://doi.org/10.2134/jeq1994.00472425002300060024x>.

Article citation:

Y. R. Peña-Martínez, J. A. Guerrero-Dallos & M. J. Martínez-Cordón. "Adsorción-desorción de diurón y ametrina en suelos de Colombia y España" *Rev. Colomb. Quím.*, vol. 47, no. 3, pp. 31-40, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v47n3.70402>.

Desarrollo de un método analítico de preparación de muestras de alimentos para determinar óxidos de colesterol (COP) mediante cromatografía

Resumen

Las transformaciones surgidas durante los procesos de limpieza de los alimentos grasos para determinar productos de oxidación de colesterol (COP) limitan los resultados reales en un estudio. Por tanto, el objetivo de este estudio fue comparar los COP obtenidos por distintos métodos de extracción: fase sólida (SPE) y cromatografía líquida en fase normal y reversa, comparando sus perfiles de elución. Adicionalmente, se tuvo como objetivo optimizar los procesos de limpieza para reducir las transformaciones de COP. Se usaron muestras de lomo de cerdo crudo, jamón serrano y salmón ahumado. Las transformaciones de COP se determinaron por SPE y GC-FID y se optimizaron los métodos de limpieza con la técnica SPE. Los cartuchos apolares no mostraron transformación de COP durante el tratamiento de muestras y los cambios de pH generaron transformaciones del triol a 6 ceto epóxido. Debido a que la limpieza del cartucho suele ser deficiente y genera coelución de compuestos indeseables (ácidos grasos) implicados en la transformación de epóxidos α y β en triol, estas transformaciones se evitaron con la técnica SPE, uso de cartuchos C₁₈, con ajuste del volumen de elución de MeOH y ajustes del pH. La reducción de los pasos de la limpieza de muestras optimizó el proceso en un 73%.

Palabras clave: colesterol; sistema de limpieza; cromatografía de gases; cartuchos apolares.

Development of an analytical method of food samples preparation to determine cholesterol oxides (COP) by chromatography

Abstract

When determining cholesterol oxidation products (COP), transformations during cleaning processes of fatty foods limit the real results in a study. Therefore, the objective of this study was to compare the COP obtained by different extraction methods, normal and reverse phase liquid chromatography and solid phase extraction (SPE), as well as their resulting elution profile. Another goal was to optimize the cleaning processes to reduce COP transformations. Samples of raw pork loin, serrano ham and smoked salmon were used. Transformations of COP were determined by SPE and GC-FID and cleaning methods with SPE technique were optimized. The apolar cartridges did not show COP transformation during samples treatment and pH changes generated transformations of triol to 6 keto epoxide. Due to cartridge cleaning is usually deficient and generates coelution of undesirable compounds (fatty acids) involved in the transformation of α and β epoxides in triol, these transformations were avoided with the SPE technique, C₁₈ cartridges, with adjustment of the MeOH elution volume, and pH settings. Reduction of samples cleaning steps optimized the process in 73%.

Keywords: cholesterol; cleaning system; gas chromatography; apolar cartridges.

Desenvolvimento de um método analítico de preparação de amostras de alimentos para determinar óxidos de colesterol (COP) por meio de cromatografia

Resumo

As transformações que surgem durante os processos de limpeza de alimentos gordurosos para determinar os produtos de oxidação do colesterol (COP) limitam os resultados reais de um estudo. Por tanto, o objetivo deste estudo foi comparar os COP obtidos pelos métodos de extração SPE e cromatografia líquida em fase normal e fase reversa, e seus perfis de eluição. Além de otimizar os processos de limpeza para reduzir as transformações dos COP. Foram utilizadas amostras de lombo de porco cru, presunto serrano e salmão defumado. As transformações dos COP foram determinadas pela SPE e a GC-FID. Foram otimizados os métodos de limpeza com a técnica de SPE. Os cartuchos apolares não mostraram transformação de COP durante o tratamento das amostras; as mudanças de pH geraram transformações do triol a 6 keto epóxido. A limpeza do cartucho geralmente é deficiente e gera coeluição de compostos indesejáveis (ácidos graxos) envolvidos na transformação dos α e β epóxidos no triol. Essas transformações foram evitadas com a técnica de SPE, o uso de cartuchos C₁₈, ajuste do volume de eluição de MeOH e ajuste do pH. A redução das etapas de limpeza das amostras otimizou o processo em 73%.

Palavras-chave: colesterol; sistema de limpeza; cromatografia gasosa; cartuchos apolares.

Introducción

La toxicidad de los productos de óxidos de colesterol (COP), compuestos que están presentes en los alimentos procesados, es bien conocida [1-4], tal como se ha observado con los 5 α y 6 α -epóxidos de colesterol relacionados con lesiones ateroscleróticas y carcinogénicas [5], así como con los compuestos 5-colesterol-3 β -25-diol y colesterol-3 β -5 α -6 β -triol que tienen actividad angiotoxicidad y citotóxica [6-10]. Estos compuestos afectan la fisiología celular al incrementar la permeabilidad en sus membranas [11-17]. Por ello, la presencia de COP en alimentos de origen animal, así como su actividad biológica nociva son objeto de muchas investigaciones que buscan comprender su mecanismo de formación y determinar sus efectos sobre la salud del ser humano [18-21].

Los COP son compuestos apolares y muy hidrosolubles que se fijan a los tejidos liposómicos y a las lipoproteínas sanguíneas. Se forman a partir del colesterol mediante tratamiento térmico, irradiación o cualquier manejo inadecuado en los procesos de fabricación de alimentos [22, 23]. Su determinación se realiza por métodos analíticos cromatográficos que permiten conocer parcialmente su comportamiento [24]. Estas técnicas analíticas presentan muchas limitantes, sobre todo en las fases de preparación de las muestras y, especialmente, en alimentos con alto contenido de grasa, ya que los pretratamientos facilitan la transformación de estos compuestos. Lo anterior genera problemas analíticos relacionados con la complejidad de la matriz y sesga su cuantificación final [25, 26].

Habitualmente, el proceso de extracción y limpieza de los COP se realiza mediante SPE (extracción en fase sólida, por sus siglas en inglés) y suele hacerse con cartuchos polares (sílica gel y amino propil). El criterio de esta elección ha sido la tradición desde 1957 [25].

Las comparaciones de los contenidos de COP a menudo son difíciles de interpretar, debido a las diferencias metodológicas usadas para su determinación, así como por la formación de artefactos creados durante su procesamiento, principalmente durante los procesos de limpieza [24].

Algunas reacciones de transformación de los COP han sido detectadas en diferentes estudios [26, 27], sin dar importancia a los procesos de preparación de las muestras en las fases preanalíticas. Es de resaltar que, durante los procesos de análisis en las metodologías convencionales, los disolventes se evaporan al limpiar las muestras, aunque tengan trazas de agua. En estos procesos el pH no se afecta en las fases iniciales, pero sí en las etapas finales (debido a la evaporación de las trazas de agua), de modo que se ha obviado el efecto del pH en las transformaciones de los COP. Esto cobra importancia en el pretratamiento de muestras de alimentos grasos, ya que, por su complejidad, presentan diversos compuestos con carácter ácido o básico. Razones por las que antes de la determinación de los COP por cromatografía de gases (GC), se debe realizar una reacción de derivatización con Tri-Sil. Esta reacción requiere extractos libres de agua para evitar la producción de ácido en el medio, lo que implica disminución del pH y reacciones de transformación de los COP y del colesterol [27].

La fase preanalítica en la preparación de muestras de alimentos para analizar los COP implica extracción, limpieza y derivatización. Estos pasos son importantes en la transformación de los COP, por lo cual se deben aplicar bajo condiciones suaves, generalmente por procesos de lixiviación [25, 28, 29, 31, 35-37]. En la Tabla 1 se resumen algunas condiciones de extracción de COP, así como sus ventajas y limitaciones. La fase preanalítica en la preparación de muestras de alimentos para analizar los COP implica extracción, limpieza y derivatización. Estos pasos son importantes en la transformación de los COP, por lo cual se deben aplicar bajo condiciones suaves, generalmente por procesos de lixiviación [25, 28, 29, 31, 35-37]. En la Tabla 1 se resumen algunas condiciones de extracción de COP, así como sus ventajas y limitaciones.

Sin embargo, no se encontraron datos sobre las condiciones críticas de la limpieza de la muestra en el proceso de análisis de los COP [23-38]. Por lo anterior, el propósito de este estudio fue comparar los COP obtenidos por dos métodos de extracción: SPE polar y apolar, así como el perfil de elución de los analitos extraídos. Además de optimizar los procesos de limpieza de muestras de alimentos grasos para reducir las transformaciones de COP y evitar artefactos en la cuantificación de este tipo de compuestos.

Materiales y métodos

En este trabajo se determinaron las transformaciones de los COP durante los procesos de limpieza de muestras aplicando SPE-GC. Para ello, se utilizaron estándares y muestras de alimentos de origen animal con alto contenido lipídico y ricos en agua (37% p/p).

Los cartuchos para SPE se utilizaron en dos modos: elución total y colección de fracciones (cromatografía líquida-LC). Se construyeron patrones de elución para comparar y detectar las diferencias entre ambos métodos, además se probaron empaques polares y no polares de los cartuchos y distintos disolventes de elución de acuerdo al sistema de limpieza probado.

También se estudió el comportamiento de siete COP y del colesterol, utilizando como técnica la separación GC-FID. Como resultado, en este estudio se propuso una metodología de preparación de muestras más confiable y menos dispendiosa para la determinación de COP en alimentos.

Reactivos

Los solventes y reactivos fueron: metanol (MeOH), n-hexano y acetona (Romil, Teknokroma, Barcelona, España); 2-propanol (2-PrOH) cloroformo, acetonitrilo (ACN), grado HPLC (Scharlau, Barcelona, España); éter de petróleo grado HPLC (Scharlau, Barcelona, España); dietil éter y acetato de etilo (Carlo Erba, Milán, Italia) grado para pesticidas; Tri-Sil (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA); tierras de diatomeas (Cultek S.L.U. Barcelona, España), monofosfato y difosfato de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania). El agua fue purificada por medio de un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA).

Los estándares COP fueron: 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OH, 98%); colesterol 5 β ,6 β -epóxido (β -epóxido, 98%); colesterol 5 α ,6 α -epóxido (α -epóxido, 9%), colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (triol, 9%); 6-cetocolesterol (6-ceto, 9%); 7-cetocolesterol (7-ceto, 9%), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania); 25-hidroxicolesterol (25-OH, 98%, Fluka, St. Louis, MO, USA) y colesterol (99% Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Se prepararon soluciones patrón de COP de 1000 mg/L, pesando las cantidades adecuadas de cada estándar sólido y disolviendo con 2-PrOH.

Muestras

Se usaron muestras de salmón ahumado, jamón serrano y lomo de cerdo procedentes de un supermercado de Madrid (España). Estas carnes fueron cortadas en trozos menores a 1,0 cm x 1,0 cm; se obtuvieron rebanadas de 50,0 g. Luego, fueron trituradas en un mortero y mezcladas hasta homogeneización con 6,0 g de tierra de diatomeas. Seguidamente, fueron envasadas al vacío en bolsas de poliestireno. Se almacenaron y protegieron de la luz a -18 °C hasta su procesamiento. Los análisis químicos fueron realizados por triplicado para cada muestra.

Tabla 1. Compendio de métodos analíticos para determinar COP en alimentos, de acuerdo a las fuentes citadas para este estudio.

Referencia bibliográfica	Muestra	Sistema de extracción		Sistema de limpieza	Ventajas	Desventajas
		Disolvente	Condiciones			
[26]	Alimento	Hex/ CO ₂ supercrítico	Agitación a T ambiente, Saponificación con KOH en MeOH	SPE cartuchos sílica, eluyente, AcOEt/Hex	<ul style="list-style-type: none"> Buena sensibilidad Método específico No es dispendioso Eficiente 	<ul style="list-style-type: none"> Requiere equipamiento adicional Puede variar pH
[28]	Suero	CHCl ₃ /MeOH	Agitación a T ambiente, saponificación, KOH en MeOH	SPE cartuchos sílica, lavado: mezclas Hex: Et ₂ O eluyente, acetona/ MeOH	<ul style="list-style-type: none"> Eficiente Detección versátil 	<ul style="list-style-type: none"> Dispendioso Cambia pH del sistema Requiere derivatización
[29]	Grasa de alimentos en Hex:DCM	-----	T ambiente	SPE con LC aminopropil, transesterificación y saponificación	<ul style="list-style-type: none"> Eficiente Detección versátil 	<ul style="list-style-type: none"> Dispendioso Cambia pH del sistema Requiere derivatización
[30]	Jamón Ibérico	CHCl ₃ :MeOH	Lixiviación	SPE cartuchos Sílica y Aminopropil, Lavados, Hex- Et ₂ O y Hex-AcOEt.	<ul style="list-style-type: none"> Buena sensibilidad Eficiente Detección genérica 	<ul style="list-style-type: none"> Dispendioso Costoso Muchas etapas
[31]	Huevo	CHCl ₃	Agitación con ultraturax	SPE, cartucho sílica, lavado, Hex: Et ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> Buena sensibilidad Eficiente Detección genérica 	<ul style="list-style-type: none"> Dispendioso Costoso Muchas etapas
[32]	Carne de aves	CHCl ₃ :MeOH	Agitación con ultraturax	SPE y Cromatografía de capa fina	<ul style="list-style-type: none"> Eficiente Detección genérica 	<ul style="list-style-type: none"> Dispendioso Costoso Muchas etapas
[33]	Alimentos con huevo	Hex/2-PrOH	60 °C y 15 MPa	SPE, cartucho amino propil	<ul style="list-style-type: none"> Consume menos reactivos Tarda menos t Extracción automatizada Reactivos poco tóxicos 	<ul style="list-style-type: none"> Requiere equipo ASE
[34]	Carne	CHCl ₃ :MeOH (2/1, v/v)	Homogeneización con disolventes, T ambiente Saponificación	SPE, cartucho sílica	<ul style="list-style-type: none"> Sensible Eficiente separación 	<ul style="list-style-type: none"> Cambia el pH Requiere derivatización

ACN: acetonitrilo; Metanol: MeOH; Hex: hexano; Pr-OH: propanol; SPE: extracción fase solida; Et₂O: éter etílico; AcOEt: acetato de etilo; T: temperatura; ASE: sistema de extracción acelerada de solventes.

Equipos y materiales

Determinación de los COP

Se utilizó un cromatógrafo de gases GC-FID (Hewlett Packard 5890, Anaheim, CA, USA) equipado con una columna capilar HP-1 (30 mm, 0,25 mm, 0,25 µm).

Confirmación de la identificación de los COP

La identificación de los COP se realizó por comparación de los tiempos de retención (t_R) de los cromatogramas de las muestras con los obtenidos de los patrones.

Adicionalmente, cada COP se confirmó comparando los espectros de masas obtenidos en las muestras y los espectros disponibles en la librería del NIST [39]. Cuando el espectro no estuvo disponible en esta librería, la identificación se confirmó por medio de los espectros obtenidos a partir de los derivados de los patrones individuales.

Condiciones cromatográficas para GC

La temperatura del inyector y del detector fue de 300 °C. El gas transportador fue He a un flujo de 1,2 mL/min; la temperatura de la columna se mantuvo constante a 270 °C. Se usaron 2,0 µL de soluciones de 5,0 mg/L de los derivados de los COP que fueron inyectados al cromatógrafo de gases usando una relación de 3:1; el tiempo de análisis fue menor a 30 min.

Obtención del extracto lipídico

Se usó un equipo para la extracción acelerada de solventes (ASE, por sus siglas en inglés) ASE™ 200 de Dionex™ (Sunnyvale, CA, USA). Para eliminar el disolvente del extracto lipídico se usó un evaporador casero con capacidad para seis muestras y un agitador vórtex.

Para la limpieza de las muestras se usó un sistema al vacío para SPE (visiprep) de Supelco (St. Louis, MO, USA). Se usaron también cartuchos de sílica gel y de amino propil SPE de 500 mg de separación aplicada (Allentown, PA, USA); cartuchos de C₁₈ y C₈ para SPE (500 mg de Discovery Supelco, USA); filtros de nylon para jeringas de 4,0 mm y 0,45 µm (National Scientific, Rockwood, TN, USA). Adicionalmente, se usó un mortero de porcelana (Staatlich, Berlin, Alemania) y viales de color ámbar de 1,4 y 12,0 mL para la separación.

Evaluación de la limpieza de la muestra aplicando el modo LC

Aplicando las ventajas de la cromatografía (fase normal e inversa), las soluciones de mezclas de COP (5,0 mg/L) se pasaron por los cartuchos acondicionados sin dejar perder el equilibrio de fases y se eluyeron de acuerdo a los experimentos de la Tabla 2.

Luego, se adicionaron alícuotas de 10 µL de solución estándar de 1000 mg/L de COP a un vial de 5,0 mL. Posteriormente se agitaron en vórtex durante 30 s y se evaporó el solvente con flujo de Ar. El residuo de COP fue disuelto con los disolventes iniciales indicados en la Tabla 2. Estas soluciones se pasaron por los cartuchos, en viales de 1,0 mL; se tomaron fracciones de los eluidos de 0,5 y 1,0 mL. Las fracciones de los COP se obtuvieron separadamente del colesterol de acuerdo a la estrategia experimental, debido a la interferencia en la evaluación de los sistemas de limpieza y a las transformaciones en COP. Se evaporó el solvente a cada fracción mediante flujo de Ar a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 mL del agente derivatizante Tri-Sil, se agitó en vórtex por 2 min y se calentó a 65 °C durante 40 min. Luego se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó el exceso de Tri-Sil mediante flujo de Ar a temperatura ambiente. El residuo fue disuelto con 400 mL de hexano y agitado en vórtex durante 2 min. Finalmente se usó un filtro de teflón de 0,45 µm y se inyectaron 4,0 µl de cada fracción al cromatógrafo.

Evaluación de la limpieza de las muestras

Este procedimiento se realizó mediante dos modos de cromatografía, una en fase líquida y otra en sólida (modo LC y SPE, respectivamente). Para determinar las diferencias entre LC y SPE (fase normal e inversa), se diseñaron los experimentos detallados en la Tabla 3, aplicando los resultados de los experimentos de la Tabla 2, los cuales permitieron conocer las cantidades adecuadas de los solventes de elución para los COP libres de colesterol.

Los COP fueron eluidos en un solo paso, eliminando el solvente inicial usado en el cartucho con flujo de Ar a 40 °C. Los eluidos se colectaron en viales de 10 mL (Tabla 3). Luego se agregaron 200 µL de Tri-Sil, se agitó en vórtex durante 2 min y se calentó a 65 °C durante 40 min. Se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente y, después, el Tri-Sil se evaporó con flujo de Ar. Luego se añadieron 500 µL de hexano, se agitó en vórtex durante 2 min, se filtró a través de membranas de teflón de 0,45 µm y al final se inyectaron 4 µL en el cromatógrafo.

Reacción de derivatización

Al residuo lipídico se le agregaron 200 µL de Tri-Sil siguiendo el procedimiento previamente descrito.

Extracción de los COP por extracción acelerada de solventes

La muestra homogenizada fue empaquetada en la celda del equipo de extracción acelerada de solventes (22 mL). El extracto lipídico se obtuvo con éter de petróleo: cloroformo (85:15, v/v), a 40 °C y 1500 psi. El extracto se colectó en viales de vidrio de 60 mL. Estos se calentaron en un termostato Tembloc a 40 °C con flujo de Ar y se evaporó el solvente hasta sequedad [38].

Tabla 2. Condiciones para los experimentos de limpieza de las muestras de alimentos grasos ricos en agua (salmón ahumado, jamón serrano y lomo de cerdo) analizados mediante cromatografía líquida de columna (LC) para detección de óxidos de colesterol (COP).

Experimento	Disolvente Inicial	LC	Fase Estacionaria	AC	Lavado C	Fase móvil
A	5,0 mL COP 2 ppm en Hex	N	Sil	5,0 mL Hex	15,0 mL Hex.:Eter 80:20	15,0 mL Hex: Acet 70:30
B	5,0 mL COP 2 ppm en Hex	N	AP	6,0 mL Hex	15,0 mL Hex: AE 90:10	20 mL Hex: Acet 90:10
C	1,0 mL COP en ACN:H ₂ O 70:30	R	C ₈	3,0 mL ACN:H ₂ O 50:50	2,0 mL ACN:H ₂ O 70:30	8,0 ml ACN:H ₂ O 80:20
D	5,0 mL COP en ACN:H ₂ O 80:20	R	C ₁₈	3,0 mL ACN	5,0 mL ACN	25,0 mL ACN: MeOH 95:05

AC: solvente de acondicionamiento del cartucho; C: cartucho; Sil: Sílica AP: amino propil; N: normal; R: reversa; LC: cromatografía líquida en columna; Hex: hexano; Acet: acetona; AE: acetato de etilo; ACN: acetonitrilo; mL: mililitro; ppm partes por millón; C₈ y C₁₈: cartuchos para SPE (500 mg de Discovery Supelco, E.U).

Tabla 3. Experimentos para el modo de limpieza SPE para analizar COP en muestras previamente tratadas de alimentos grasos ricos en agua (salmón ahumado, jamón serrano y lomo de cerdo).

Experimento	Solvente de COP	LC	FE	AC	Lavado	Fase Móvil
A	5 mL COP 2 ppm en Hex	N	Sil	5 mL Hex	15 mL de Hex:Eter 80:20	10 mL Acet
B	5 mL COP 2 ppm en Hex	N	AP	5 mL Hex	15 mL Hex.:Acet. etilo 90:10	10 mL Acet
C	1 mL COP en ACN:H ₂ O 70:30	R	C ₈	3 mL ACN:H ₂ O 50:50	2 mL ACN:H ₂ O 70:30	8 mL ACN:H ₂ O 80:20
D	5 mL COP en ACN:H ₂ O 80:20	R	C ₁₈	3 mL ACN	5 mL ACN	10 mL MeOH

AC: solvente de acondicionamiento del cartucho; COP: Óxidos de colesterol; LC: cromatografía líquida; FE: fase estacionaria; C: cartucho; Sil: Silica; AP: amino propil; Hex: hexano; Acet: acetona; ACN: acetonitrilo N: normal R: reversa; mL: mililitro; ppm partes por millón; C₈ y C₁₈: cartuchos para SPE (500 mg de Discovery Supelco, E.U).

Determinación de los COP

El extracto obtenido en la sección anterior se filtró con membrana de nylon de 45 μ m. Se tomaron 2 μ L y se inyectaron al cromatógrafo usando las condiciones indicadas anteriormente.

Para identificar los derivados Tri-Sil se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas con analizador de tiempo de vuelo (Waters® Q-ToF Premier™, Milford, MA, USA). Además se usó la librería de espectros de masas NIST 2.0 [39]. Los espectros se obtuvieron en el rango 50-800 unidades de masa aplicando el modo escaneo a 70 eV. Se inyectó 1 μ L de esta mezcla al equipo GC-Q-TOF.

Identificación de los derivados de COP mediante GC-Q-TOF

Patrones

Se identificaron los Tri-Sil derivados de los COP por GC-Q-TOF a partir de una mezcla de estándar de COP de 5 mgL⁻¹. Estos se obtuvieron aplicando el procedimiento descrito previamente. La separación cromatográfica se realizó utilizando la columna DB-5 con el siguiente programa de temperatura: T inicial 220 °C (1 min.), seguido de una rampa de 5 °C/min hasta 290 °C (11 min.), seguido de una rampa de 3 °C/min, hasta 310 °C (28 min.). Se utilizó un inyector split-splitless a 310 °C a una relación de 10:1 y He como gas portador a un flujo de 1 mL/min. La fragmentación se realizó a 70 eV, se obtuvieron los espectros en forma *scan* y se llevaron a cabo las respectivas identificaciones de las estructuras moleculares mediante la librería de espectros de masas del NIST [39].

Resultados y discusión

Cromatografía líquida de columna (LC)

En el experimento A de la Tabla 2, la Tabla 4 y la Figura 1, se muestra que los compuestos 7 β -OH, β -epóxido y α -epóxido eluyen después de agregar entre 2,0 y 5,0 mL de eluyente, respectivamente.

Los perfiles de elución tienen forma gaussiana; las recuperaciones son de 94,9%, 90,9 y 99,0% respectivamente (Tabla 4), indicando que la extracción y la limpieza son adecuadas para estos compuestos (Figura 1).

El proceso de elución del triol no es gaussiano, pues la recuperación fue muy baja (68,5%). En la Figura 1 también se observa que el 6-ceto eluye completamente entre 1,0 y 5,0 mL y vuelve a aparecer en fracciones posteriores, indicando posibles transformaciones de triol a 6-ceto, ya que este tiene porcentajes de recuperación mayores al 100% (Figura 1). El colesterol eluye, junto con el solvente inicial y los lavados del cartucho, en las primeras fracciones por ser el compuesto menos polar de la mezcla.

Cromatografía líquida en columna (LC) en fase normal con cartucho de silica

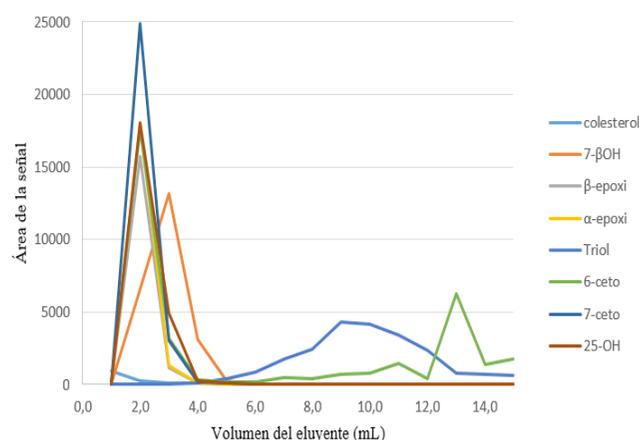


Figura 1. Perfil de elución de los COP en cromatografía líquida en columna en fase normal. Disolvente inicial: 5,0 mL COP (2 ppm) en hexano. Fase estacionaria: silica. Acondicionamiento del cartucho: hexano (5 mL). Lavado del cartucho: 15,0 mL hexano:éter (80:20). Fase móvil: 15,0 mL, hexano:acetona 70:30.

La Figura 2 explica las siguientes transformaciones: los compuestos 7-ceto y 25-OH muestran una forma gaussiana clara debido a que eluyen entre 2,0 y 5,0 mL de la fase móvil y sus recuperaciones son altas (89,18% y 98,58% respectivamente). Es importante resaltar que los errores en estos experimentos son aditivos entre fracción y fracción. Sin embargo, fue necesario hacer la suma de las áreas para cada compuesto presente en las diferentes fracciones, para compararlas con las áreas generadas por la cantidad de patrones adicionados inicialmente. Este fenómeno confirma que el colesterol no es oxidado en el proceso analítico, siendo el único precursor de los COP.

Tabla 4. Recuperación de COP en cromatografía líquida en columna en fase normal. Disolvente inicial: 5,0 mL COP (2 ppm) en hexano. Fase estacionaria: sílica. Acondicionamiento del cartucho: hexano (5 mL). Lavado del cartucho: 15,0 mL Hexano:Eter (80:20). Fase móvil: 15,0 mL, hexano: acetona 70:30.

V (mL)	Recuperación (%)						
	7-βOH	β-epóxido	α-epóxido	Triol	6-ceto	7-ceto	25-OH
1,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,7	N.D.	N.D.
2,0	27,0	84,3	91,4	N.D.	77,3	86,8	68,9
3,0	53,9	6,1	6,9	N.D.	14,2	10,6	18,8
4,0	12,9	0,5	0,7	0,4	1,5	0,8	1,0
5,0	1,2	N.D.	N.D.	1,3	0,7	0,4	0,5
6,0	N.D.	N.D.	N.D.	2,7	0,7	N.D.	N.D.
7,0	N.D.	N.D.	N.D.	5,5	2,1	N.D.	N.D.
8,0	N.D.	N.D.	N.D.	7,7	1,7	N.D.	N.D.
9,0	N.D.	N.D.	N.D.	13,4	3,1	N.D.	N.D.
10,0	N.D.	N.D.	N.D.	13,0	3,5	N.D.	N.D.
11,0	N.D.	N.D.	N.D.	10,6	6,4	N.D.	N.D.
12,0	N.D.	N.D.	N.D.	7,2	1,9	N.D.	N.D.
13,0	N.D.	N.D.	N.D.	2,4	27,6	N.D.	N.D.
14,0	N.D.	N.D.	N.D.	2,2	6,1	N.D.	N.D.
15,0	N.D.	N.D.	N.D.	2,1	7,9	N.D.	N.D.
R.P	94,9	90,9	99,0	68,5	155,3	98,6	89,2

N.D. no detectado; R.P: sumatoria de las recuperaciones parciales de COP.

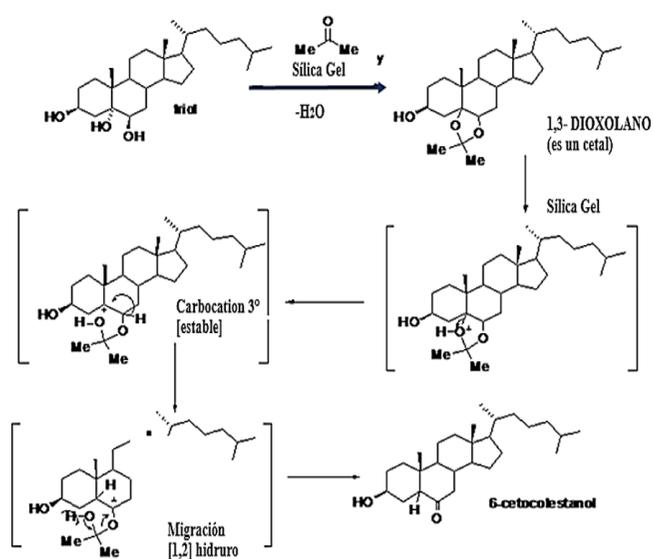


Figura 2. Mecanismos de reacción de transformación de triol en 6-ceto [40].

Al revisar los resultados del experimento B (Tabla 2) en la Tabla 5 y Figura 3, con el cartucho de amino propil, se observó que los COP 7β-OH, β-epóxido, α-epóxido 7-ceto y 25-OH eluyeron entre 0,0 and 5,0 mL de fase móvil. Estos compuestos presentan forma gaussiana y bajas recuperaciones: entre 73,3 % y 85,0 %. El comportamiento del triol y el 6-ceto se observa de forma similar al comportamiento observado con cartuchos de sílica (Tabla 4 y Figura 1).

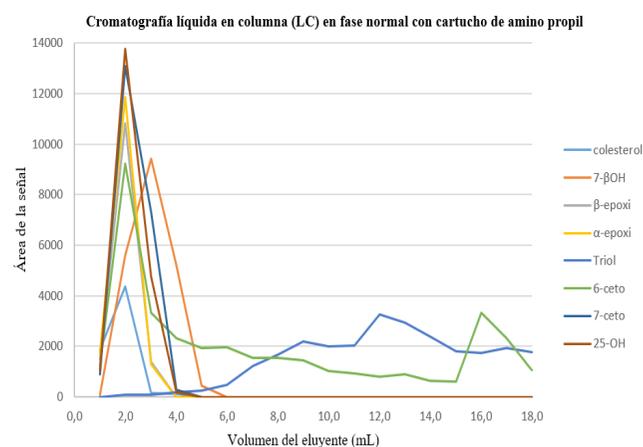


Figura 3. Perfil de elución de los COP en cromatografía líquida en columna en fase normal. Disolvente inicial: 5,0 mL COP (2 ppm) en hexano. Fase estacionaria: amino propil. Acondicionamiento del cartucho: hexano (5 mL). Lavado del cartucho: 15,0 mL hexano:acetato de etilo (90:10). Fase móvil: 10,0 mL, acetona.

De acuerdo con el experimento C de la Tabla 2, cuyos resultados se presentan en la Tabla 6 y la Figura 4, al usar cartuchos C₈, los COP presentan un comportamiento gaussiano. Bajo esas condiciones, los compuestos eluyen de manera regular de acuerdo con las polaridades de cada uno. No se observó colesterol en ninguna fracción y las recuperaciones tuvieron un rango óptimo (81,8% a 94,9%). Además, no se observaron reacciones de transformación. Este sistema presenta la desventaja de tener una alta capacidad de retención, por tanto, se requiere aplicar cantidades elevadas de solvente de lavado para eliminar compuestos polares de muestras complejas (como los alimentos).

Tabla 5. Recuperación de COP en cromatografía líquida en columna en fase normal. Disolvente inicial: 5,0 mL COP (2 ppm) en hexano. Fase estacionaria: amino propil. Acondicionamiento del cartucho: hexano (5 mL). Lavado del cartucho: 15,0 mL hexano:acetato de etilo (90:10). Fase móvil: 10,0 mL, acetona.

V (mL)	Recuperación (%)						
	7-βOH	β-epóxido	α-epóxido	Triol	6-ceto	7-ceto	25-OH
1,0	0,4	8,0	8,8	0,0	5,5	3,1	4,0
2,0	22,9	57,9	60,3	0,3	40,6	45,6	52,5
3,0	38,6	7,3	6,5	0,3	14,7	25,6	18,1
4,0	21,3	N.D.	N.D.	0,5	10,2	1,0	0,7
5,0	1,8	N.D.	N.D.	0,8	8,4	N.D.	N.D.
6,0	N.D.	N.D.	N.D.	1,0	8,7	N.D.	N.D.
7,0	N.D.	N.D.	N.D.	3,8	6,8	N.D.	N.D.
8,0	N.D.	N.D.	N.D.	5,1	6,8	N.D.	N.D.
9,0	N.D.	N.D.	N.D.	6,8	6,4	N.D.	N.D.
10,0	N.D.	N.D.	N.D.	6,2	4,5	N.D.	N.D.
11,0	N.D.	N.D.	N.D.	6,3	4,1	N.D.	N.D.
12,0	N.D.	N.D.	N.D.	10,1	3,5	N.D.	N.D.
13,0	N.D.	N.D.	N.D.	9,1	4,0	N.D.	N.D.
14,0	N.D.	N.D.	N.D.	7,4	2,7	N.D.	N.D.
15,0	N.D.	N.D.	N.D.	5,6	2,7	N.D.	N.D.
16,0	N.D.	N.D.	N.D.	5,4	14,6	N.D.	N.D.
17,0	N.D.	N.D.	N.D.	6,0	10,2	N.D.	N.D.
18,0	N.D.	N.D.	N.D.	5,5	4,7	N.D.	N.D.
R.P.	85,0	73,3	75,6	80,8	158,9	75,3	75,3

N.D.: No detectable; R.P.: Sumatoria de las recuperaciones parciales

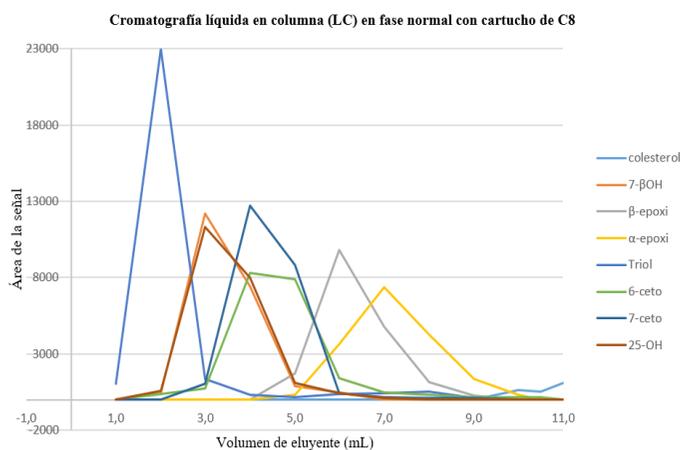


Figura 4. Perfil de elución de los COP en cromatografía líquida en columna en fase normal. Disolvente inicial: 1,0 mL de COP en acetonitrilo:agua (70:30). Fase estacionaria: cartuchos de C₈. Acondicionamiento del cartucho: 3,0 mL acetonitrilo:agua (50:50). Lavado del cartucho: 2,0 mL acetonitrilo:agua (70:30). Fase móvil: 8,0 mL, acetonitrilo:agua (80:20).

En el experimento D de la Tabla 2 con cartuchos C₁₈ (Figura 5 y Tabla 7) se muestra que el comportamiento de elución de los COP, bajo estas condiciones, es muy irregular (no-gaussiano), debido a que estos compuestos son fuertemente retenidos por esta fase. En este sistema la separación de los COP involucra una nueva variable: el peso molecular. Sin embargo, esta variable no se estudió porque la prioridad fue revisar la polaridad de los compuestos.

A pesar de que el triol es el compuesto más polar, no eluyó en las primeras fracciones. Este compuesto apareció después de agregar 3,0 mL de la fase móvil, probablemente por su alto peso molecular. Por el contrario, el 6-ceto eluyó en las primeras fracciones por su menor peso molecular, a pesar de ser uno de los compuestos menos polares.

Se observó que los compuestos β-epóxidos y α-epóxidos requieren mayores cantidades de eluyente que el 6-ceto, aunque tengan un peso molecular bajo. Esto indica que la elución depende no solo de la polaridad, sino del peso molecular del compuesto al usar los cartuchos de C₁₈.

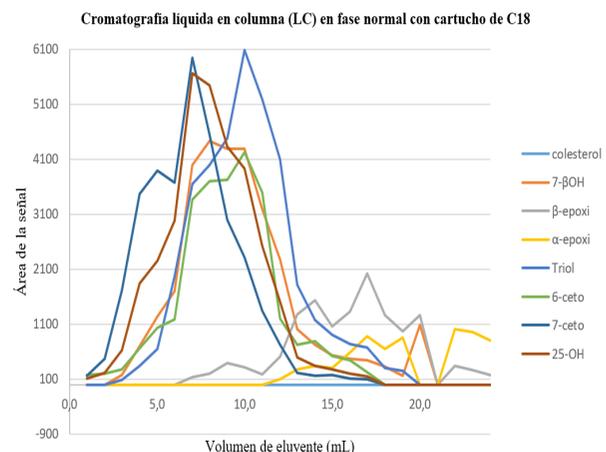


Figura 5. Perfil de elución de los COP en cromatografía líquida en columna en fase normal. Disolvente inicial: 5,0 mL de COP en acetonitrilo:agua (80:20). Fase estacionaria: cartuchos de C₁₈. Acondicionamiento del cartucho: 3,0 mL acetonitrilo. Lavado del cartucho: 5,0 mL acetonitrilo. Fase móvil: 25,0 mL, acetonitrilo:metanol (95:05).

Tabla 6. Recuperación de COP en cromatografía líquida en columna en fase reversa. Disolvente inicial: 1,0 mL de COP en acetonitrilo:agua (70:30). Fase estacionaria: cartuchos de C₈. Acondicionamiento del cartucho: 3,0 mL acetonitrilo:agua (50:50). Lavado del cartucho: 2,0 mL acetonitrilo:agua (70:30). Fase móvil: 8,0 mL, acetonitrilo:agua (80:20).

V (mL)	Recuperación (%)						
	7-βOH	β-epóxido	α-epóxido	Triol	6-ceto	7-ceto	25-OH
1,0	N.D.	N.D.	N.D.	3,3	N.D.	N.D.	N.D.
2,0	1,8	N.D.	N.D.	71,3	1,7	N.D.	2,1
3,0	49,8	N.D.	N.D.	4,2	3,3	3,6	43,1
4,0	30,4	N.D.	N.D.	1,0	36,5	44,4	30,5
5,0	3,7	9,2	1,6	0,5	34,7	30,9	4,2
6,0	1,9	52,7	18,4	1,1	6,1	1,4	1,5
7,0	N.D.	25,5	37,5	1,3	2,1	0,6	0,4
8,0	N.D.	6,0	21,8	1,6	1,3	0,4	N.D.
9,0	N.D.	1,5	7,0	0,3	0,7	0,3	N.D.
10,0	N.D.	N.D.	1,7	N.D.	0,6	0,0	N.D.
11,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,6	0,0	N.D.
R.P.	87,6	94,9	87,9	84,8	87,7	81,6	81,8

N.D.: no detectable; R.P.: Sumatoria de las recuperaciones parciales

Tabla 7. Recuperación de COP en cromatografía líquida en columna en fase reversa. Disolvente inicial: 5,0 mL de COP en acetonitrilo:agua (80:20). Fase estacionaria: cartuchos de C₁₈. Acondicionamiento del cartucho: 3,0 mL acetonitrilo. Lavado del cartucho: 5,0 mL acetonitrilo. Fase móvil: 25,0 mL, acetonitrilo:metanol (95:05).

V (mL)	Recuperación (%)						
	7-βOH	β-epóxido	α-epóxido	Triol	6-ceto	7-ceto	25-OH
1,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,7	0,5	0,3
2,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,8	1,5	0,7
3,0	0,6	N.D.	N.D.	0,2	1,1	5,4	2,1
4,0	2,6	N.D.	N.D.	1,0	2,7	11,0	6,1
5,0	4,7	N.D.	N.D.	1,8	4,2	12,3	7,4
6,0	6,4	N.D.	N.D.	5,6	4,8	11,6	9,8
7,0	15,1	0,7	N.D.	10,4	13,6	18,8	18,7
8,0	16,8	1,1	N.D.	11,3	14,9	14,4	18,0
9,0	16,2	2,1	N.D.	12,7	15,0	9,4	14,3
10,0	16,2	1,7	N.D.	17,3	17,1	7,3	13,0
11,0	12,0	1,0	N.D.	14,7	14,1	4,2	8,3
12,0	8,6	2,7	0,5	11,6	4,8	2,3	5,0
13,0	3,8	6,8	1,4	5,2	2,9	0,7	1,6
14,0	2,7	8,2	1,7	3,3	3,2	0,5	1,1
15,0	2,0	5,7	1,6	2,6	2,1	0,5	0,9
16,0	1,8	7,1	3,0	2,1	1,8	0,4	0,6
17,0	1,7	10,8	4,5	1,9	0,9	0,3	0,5
18,0	1,2	6,8	3,3	0,9	N.D.	N.D.	N.D.
19,0	0,6	5,2	4,4	0,7	N.D.	N.D.	N.D.
20,0	4,1	6,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
21,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
22,0	N.D.	1,8	5,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
23,0	N.D.	1,4	4,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
24,0	N.D.	0,9	4,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
R.P.	117,2	70,7	34,2	103,2	104,7	101,0	108,6

N.D.: No detectable; R.P.: Sumatoria de las recuperaciones parciales

Modo Extracción fase sólida (SPE)

Después de aplicar los métodos de la Tabla 3, se obtuvieron las recuperaciones de la Tabla 8.

Se observa en los experimentos A y B que las recuperaciones de compuestos polares son relativamente pequeñas, por ejemplo, las recuperaciones de triol en los experimentos A y B son muy bajas (60 y 56%).

Teniendo en cuenta que solo se evalúan las pérdidas que ocurren en la limpieza de muestras mediante SPE, en el experimento C hay valores de recuperación relativamente pequeños para los compuestos β y α -epóxido. Estas pérdidas por reacciones de hidrólisis ocurren en el momento de eliminar el solvente. El experimento D muestra los mejores resultados de recuperación. Por lo anterior, se seleccionaron los métodos C y D de la Tabla 3 y se aplicaron a muestras reales.

Después de revisar los resultados obtenidos en los experimentos de la Tabla 2, se descartaron los sistemas de limpieza de los experimentos A y B, ya que se evidencian las transformaciones de triol a 6-ceto. Con base en la Tabla 2, se resalta que el mejor comportamiento lo presentó el sistema del cartucho C_8 (experimento C), probado para muestras de alimentos, aunque presentó la desventaja de tener muy baja retención. Adicionalmente, el cartucho C_8 con muestras enriquecidas proporcionó valores de recuperación muy bajos con los dos eluyentes mencionados. Tampoco permitió la limpieza adecuada de las muestras y presentó mucha suciedad en los cromatogramas.

Es importante resaltar que los valores de recuperación fueron muy dispersos y que estos resultados se deben a la poca retención observada en el cartucho C_8 . Usando el cartucho C_{18} y MeOH como eluyente, se aplicó la metodología D (Tabla 3) con muestras enriquecidas. Se observaron recuperaciones cercanas al 100% para la mayoría de los COP, excepto para los epóxidos α y β cuyas recuperaciones fueron inferiores al 50%. La recuperación del triol fue mayor al 100%, probablemente porque la transformación de los COP en triol en las muestras de alimentos se presentó durante la evaporación del eluyente por cambios del pH y debido a la aparición de reacciones de hidrólisis ácida según soportan estudios previos [27].

Ulberth y Rössler [35] compararon diferentes sistemas SPE, combinando fases estacionarias (NH_2 , Silica y C_{18}), disolventes de lavado (Acetato de etilo, hexano, dietil éter, diclorometano, 2-propanol, metilertbutil éter, acetonitrilo, metil tert-butil éter y agua) y disolventes de elución (acetona y metanol) para limpiar las muestras después de realizar la extracción lipídica. Estos autores encontraron que la mejor combinación consistía en hacer dos limpiezas mediante SPE en serie, con cartuchos de sílica y NH_2 , usando como disolvente de lavado mezclas de hexano-dietil éter y hexano-acetato de etilo y, como disolvente de elución, acetona en ambos casos, descartando los cartuchos apolares C_{18} .

Es importante resaltar que en este trabajo, contrario a Ulberth y Rössler [35], se realizó el estudio aplicando el modo LC, sin identificar las transformaciones que se presentaron en los COP por cambios en el pH.

Tabla 9. Influencia del pH de la solución tampón de fosfato usada en el proceso de evaporación del solvente de los COP en muestras enriquecidas con 25 ppm de salmón ahumado. Extracción: SPE. Solvente: 5 mL de COP en acetonitrilo:agua (80:20) Fase estacionaria: cartuchos de C_{18} (fase reversa). Acondicionamiento del cartucho: 3,0 mL acetonitrilo. Lavado del cartucho: 5,0 mL acetonitrilo. Fase móvil: 10,0 mL, metanol.

pH	Recuperación (%)					
	7- β OH	β -epóxido	α -epóxido	Triol	7-ceto	25-OH
4,0	103,5	74,6	69,2	41,1	90,6	91,3
4,5	121,6	88,1	76,2	112,8	90,8	103,7
5,0	112,5	92,9	80,1	106,5,0	83,3	97,6
5,5	103,2	84,6	71,2	82,2	95,8	96,3
6,0	102,0	80,5	79,9	80,0	93,7	94,4
6,5	113,2	103,7	95,2	16,2	102,4	113,6
7,0	100,1	72,5	48,5	23,8	94,1	100,2

Para verificar si el pH era el factor responsable de las transformaciones al usar el cartucho C_{18} , se aplicó una mezcla de COP y estándares de colesterol con el método SPE (Tabla 9). La elución de COP se llevó a cabo usando un volumen equivalente al volumen de elución empleado en el experimento D de LC (Tabla 3). Los COP eluidos se recogieron en viales que contenían 100 μ L de tampón a pH en el rango 4,0 a 7,0 antes de evaporar el disolvente de elución; las recuperaciones obtenidas se presentan en la Tabla 9. Se observa que los amortiguadores con valores de pH entre 4,5 y 6,0 permiten obtener mejores recuperaciones. Las observaciones encontradas en este estudio permitieron diseñar una nueva metodología que disminuye las transformaciones de los COP, detallada a continuación.

Metodología propuesta para la determinación de COP en muestras de alimentos por cromatografía con minimización de transformaciones

Se propone la siguiente metodología: obtener el extracto lipídico aplicando la extracción acelerada de solventes (ASE); eliminar el solvente con flujo de argón a 40 °C; disolver el residuo con 5 mL de una mezcla 80:20 de acetonitrilo:agua (v/v).

Tabla 8. Porcentajes de recuperación de COP usando SPE con mezcla estándar (25 mg).

Experimento	7- β OH (%)	β -epóxido (%)	α -epóxido (%)	triol (%)	6-ceto (%)	7-ceto (%)	25-OH (%)
A	80,4	95,7	99,6	60,4	101,1	98,0	85,1
B	82,2	101,6	90,9	56,2	102,2	95,8	83,7
C	97,9	45,6	70,8	102,9	96,7	94,7	116,2

Ver Tabla 3 para más información sobre las condiciones de cada experimento.

Así mismo, pasar la muestra a través de un cartucho C_{18} previamente acondicionado con acetonitrilo; limpiar el cartucho con 5 mL de acetonitrilo; eliminar el acetonitrilo con flujo de argón; eluir los COP con 10 mL de MeOH; recoger el eluato en un vial que contenga 100 μ L de un tampón fosfato a pH 6,00; eliminar el disolvente a sequedad con flujo de argón a 40 °C; realizar el proceso de derivatización con Tri-Sil; disolver el residuo con 500 μ L de hexano; filtrar con membrana de teflón e inyectar en el cromatógrafo de gases.

Conclusiones

Los COP triol, α -epóxido y β -epóxido son inestables en condiciones normales de limpieza de la SPE usando cartuchos de sílice y aminopropilo. Se verificaron las transformaciones de COP mediante perfiles de elución usando el modo de colección de fracción. El triol se transformó en 6-ceto y α -epóxido y β -epóxido debido a los cambios de pH. Los cartuchos apolares no mostraron transformación de COP durante el tratamiento de muestra de alimentos. Aunque el modo de recolección de fracciones usando cartuchos C_8 es adecuado para separar el colesterol de los estándares de los COP, su capacidad limitada para retener COP presentó dificultades para su determinación en muestras de alimentos. Debido a que la limpieza de cartucho es deficiente, se genera coelución de compuestos.

Se obtuvieron resultados más adecuados aplicando la metodología propuesta para la determinación de los COP en muestras de alimentos en las condiciones óptimas: limpieza SPE usando cartuchos C_{18} , ajustando cuidadosamente el pH (rango entre 4 y 6) y optimizando el volumen de elución de MeOH (10 mL). Bajo estas condiciones, se evitaron las transformaciones. En consecuencia, no se detectó 6-ceto en muestras de alimentos y pudo usarse como estándar interno para la determinación de COP. El volumen total de solvente usado fue de aproximadamente 20% del volumen utilizado por métodos convencionales. Adicionalmente, el método propuesto necesita menos pasos en la limpieza de las muestras. Aplicando este método se obtuvieron recuperaciones superiores al 73% en las muestras de alimentos estudiadas.

Referencias

- [1] E.T. Finocchiaro & T. Richardson, "Sterol oxides in food-stuffs: a review" *J. Food Protect.* vol. 46, n° 1, pp. 917-925, 1983. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.10.917>.
- [2] S. K. Peng & C. B. Taylor, "Cholesterol autoxidation, health and arteriosclerosis" *World Rev. Nutr. Diet.* vol. 44, n° 1, pp.117-154, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1159/000409439>.
- [3] S. Böesinger, W. Luf & E. Brandl, "Oxysterols: their occurrence and biological effects" *Int. Dairy J.* vol. 3, n° 1, pp. 1, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(93\)90073-9](https://doi.org/10.1016/0958-6946(93)90073-9).
- [4] P. Paniangvait, A. J. King, A. D. Jones & B.G. German, "Cholesterol oxides in foods of animal origin" *J. Food Sci.* vol. 606, n° 1, pp. 1159-1174, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb04548.x>.
- [5] F. Guardiola, R. Codony, P. B. Addis, M. Rafecas & J. Boatella, "Biological effects of oxysterols: current status" *Food Chem. Toxicol.* vol. 34, n° 2, pp. 193-211, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00094-1](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00094-1).
- [6] P. S. W. Park & P. B. Addis, "Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow" *J. Agr. Food Chem.* vol. 34, pp. 653-659, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf00070a016>.
- [7] J. Nourooz-Zadeh & L. A. Appelquist, "Cholesterol Oxides in Swedish Foods and Food Ingredients: Fresh Eggs and Dehydrated Egg Products" *J. Food Sci.*, vol. 52, pp. 57-67, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb13972.x>.
- [8] W. B. Zhang, P. B. Addis & T. P. Krick, "Quantification of 5 α -cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol and other cholesterol oxidation products in fast food French fried potatoes" *J. Food Sci.* vol. 56, pp. 716-718, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb05364.x>.
- [9] H. Liu, T. Wang & K. Huang, "Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol-induced reactive oxygen species production promotes mitochondrial dysfunction in isolated mice liver mitochondria" *Chemico-Biological Interactions*, vol. 179, pp. 81-87, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.12.003>.
- [10] L. Po-Lin, C. Yu-Wen, L. Ching-Hao, L. Yi-Ling & K. Jaw-Jou, "Cholesterol-3-beta, 5- α , 6- β induced PI₃K-Akt-eNOS-dependent cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells" *Toxicol. Letters*, vol. 190, pp. 172-178, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.012>.
- [11] B. Henning & G.A. Boissonneault, "Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol decreases barrier function of cultured endothelial cell monolayers" *Atherosclerosis*, vol. 68, no. 3, pp. 255-261, 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(87\)90205-X](https://doi.org/10.1016/0021-9150(87)90205-X).
- [12] A. J. Brown & W. Jessup, "Review article, Oxysterols and atherosclerosis" *NSW 2050, Australia, Atherosclerosis*. vol. 142, pp. 21-28, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(98\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(98)00196-8).
- [13] G. Poli, B. Sottero, S. Gargiulo & G. Leonarduzzi, "Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis", *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 30, pp. 180-189, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.003>.
- [14] H. Tavori, M. Aviram, S. Khatib, R. Musa, S. Nitecki, A. Hoffman & J. Vaya, "Human carotid atherosclerotic plaque increases oxidative state of macrophages and low-density lipoproteins, whereas paraoxonase 1 (PON1) decreases such atherogenic effects" *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 46, pp. 607-615, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.019>.
- [15] G. Leonarduzzi, P. Gamba, S. Gargiulo, B. Sotero, A. Kadl, F. Biasi, E. Chiarpotto, N. Leitinger, G. Vendemiale, G. Serviddio & G. Poli, "Oxidation as a crucial reaction for cholesterol to induce tissue degeneration: CD36 overexpression in human promonocytic cells treated with a biologically relevant oxysterol mixture" *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 7, pp. 375-382, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00386.x>.
- [16] D. Bach, R. F. Epand, R. M. Epand, I. R. Miller & E. Wachtel, "The oxidized form of cholesterol 3 β -hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al induces structural and thermotropic changes in phospholipid membranes", *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 161, n° 2, pp. 95-102, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.07.006>.
- [17] A. J. Brown & W. Jessup, "Review: Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis" *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 30, pp.111-122, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.005>.
- [18] H. Girao O, M. C. Mota, J. Ramalho & P. Pereira, "Cholesterol Oxides Accumulate in Human Cataracts" *Exp. Eye Res.*, vol. 66, pp. 645-652, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1006/exer.1998.0465>.
- [19] D. Tsuzuki, K. Sumino & M. Yokoyama, "Analysis of 7-ketocholesterol in low density lipoprotein and fatty acid composition in erythrocyte membranes of patients on maintenance hemodialysis and healthy controls" *Clinica Chimica Acta*, vol. 295, pp. 155-168, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(00\)00199-6](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(00)00199-6).

- [20] S. Lordan, J. J. Mackrill & N. M. O'Brien, "Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases" *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 20, pp. 321-336, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.001>.
- [21] D. Töröcsik, A. Szanto & L. Nagy, "Oxysterol signaling links cholesterol metabolism and inflammation via the liver X receptor in macrophages" *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 30, pp. 144-152, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.002>.
- [22] S. J. Hur, G. B. Park & S.T. Joo, "Formation of cholesterol oxidation products (COP) in animal products" *Food Control*, vol. 18, pp. 939-947, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.05.008>.
- [23] A. B. Valenzuela, J. C. Sanhueza & S. K. Nieto, "¿Es posible mejorar la calidad nutricional de los aceites comestibles?" *Rev. Chil. Nutr.*, vol. 29, pp. 1, 2002. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0717-75182002029100002>.
- [24] T. P. Busch & A. J. King, "Artifact generation and monitoring in analysis of cholesterol oxide products" *Analytical Biochemistry*, vol. 388, pp. 1-14, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.12.034>.
- [25] J. Folch, M. Lees & G. H. Sloane-Stanley, "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues" *Journal of Biological Chemistry*, vol. 226, pp. 497-509, 1957. <http://webpages.icav.up.pt/ptdc/CVT/098487/2008/Folch,%201957.pdf>
- [26] B. Lu, Y. Zhang, X. Wu & J. Shi, "Separation and Determination of Diversiform Phytosterols in Food Materials Using Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Ultrapermance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry" *Analytica Chimica Acta*, vol. 588, pp. 50-63, 2007.
- [27] J. H. Nielsen, C. E. Olsen & L. H. Skibsted, "Cholesterol oxidation in a heterogeneous system initiated by water-soluble radicals" *Food Chemistry*, vol. 56, pp. 33-37, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00146-8](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00146-8).
- [28] M. Menéndez-Carreño, D. Knol & H. Janssen, "Development and validation of methodologies for the quantification of phytosterols and phytosterol oxidation products in cooked and baked food products" *J. Chromatogr. B*, vol. 8, n° 1428, pp. 316-325, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.073>.
- [29] C. B. Johnson, "Isolation of cholesterol oxidation products from animal fat using aminopropyl solid-phase extraction" *Journal of Chromatography A*, vol. 736, pp. 205-210, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)01322-9](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)01322-9).
- [30] M. J. Petró, J. A. García-Regueiro, L. Martín, E. Muriel & T. Antequera, "Identification and Quantification of Cholesterol and Cholesterol Oxidation Products in Different Types of Iberian Hams", *Agric. Food Chem.*, vol. 51, n° 19, pp. 5786-5791, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf034100a>.
- [31] L. Shu-Mei, J. Ian-Gray & M. E. Zabik, "Evaluation of Solid Phase Extraction and Gas Chromatography for Determination of Cholesterol Oxidation Products in Spray-Dried Whole Egg" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 43, n° 5, pp. 1122-1126, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf00053a002>.
- [32] J. A. García-Regueiro & C. Marachiello, "Procedure for the Determination of Eighth Cholesterol Oxides in Poultry Meat Using On-column and Solvent Venting Capillary Gas Chromatography" *Journal of Chromatography A*, vol. 764, n° 2, pp. 279-293, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(96\)00897-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(96)00897-7).
- [33] E. Boselli, V. Velazco, M. F. Caboni & G. Lercker, "Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food" *Journal of Chromatography A*, vol. 917, pp. 239-244, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)00688-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)00688-4).
- [34] M. Careri, A. Mangia, M. Musci & G. Parolari, "Development of Gas Chromatographic Method for Determination of Cholesterol Oxides in Meat Products" *Chromatographia*, vol. 47, n° 1-2, pp. 42-48, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf02466784>.
- [35] F. Ulberth & D. Rossler, "Comparison of solid-phase extraction methods for the cleanup of cholesterol oxidation products" *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, pp. 2634-2637, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf980012s>.
- [36] E. G. Blich & W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification" *J. Biochem. Physiol.* vol. 37, pp. 911-917, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- [37] D. U. Ahn, K. C. Nam, M. Du & C. Jo, "Effect of irradiation and packaging conditions after cooking on the formation of cholesterol and lipid oxidation products in meats during storage" *Meat Science*, vol. 57, pp. 413-418, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(00\)00119-4](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(00)00119-4).
- [38] J. J. Lozada-Castro, M. J. Santos-Delgado & L. M. Polo-Díez, "Determination of free cholesterol oxide products in food samples by gas chromatography and accelerated solvent extraction: influence of electron-beam irradiation on cholesterol oxide formation" *J. Sci. Food Agric.* vol. 96, n° 12, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7625>.
- [39] National Institute of Standards and Technology, "NIST Standard Reference Database 1A v17," *STANDARD REFERENCE DATA*, June 19, 2014. [Online]. Available on: <https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-1a-v17>. [Accessed February 7, 2018]
- [40] J. J. Lozada Castro, "Determinación de óxidos de colesterol en muestras de alimentos mediante cromatografía de gases," Ph. D. Dissertation, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, 2013. [Online]. Available on: <https://eprints.ucm.es/22410/1/T34599.pdf>.

Article citation:

J. J. Lozada-Castro & M. Figueroa-Macca. "Desarrollo de un método analítico de preparación de muestras de alimentos para determinar óxidos de colesterol (COP) mediante cromatografía" *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 47, no. 3, pp. 41-51, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v47n3.72437>.



Modelos matemáticos de parámetros reológicos y su influencia en el sistema de bombeo de fluidos no newtonianos

Resumen

En la presente investigación se realizó un estudio de la influencia de los parámetros reológicos de las hidromezclas lateríticas con los parámetros energéticos de los sistemas de bombeo que garantizan la productividad en la obtención de sulfuro de níquel. A partir de estudios experimentales como técnicas de difracción de rayos-X, fluorescencia de rayos-X y análisis de tamaño de partículas se modelaron los comportamientos de la viscosidad aparente, el esfuerzo cortante inicial, el índice de consistencia másica y el índice de flujo. Lo anterior, en función de los siguientes factores: temperatura, contenido de sólidos, composición química y granulométrica. Los resultados evidenciaron que las suspensiones lateríticas se comportan como fluidos no newtonianos con plasticidad, debido a su carácter de materiales polidispersos, con un predominio de granulometría fina (partículas menores de 0,045 mm). Esto explica sus comportamientos reológicos, ajustables al modelo de Bulkley-Herschel a valores de temperatura de 28 a 90 °C y concentración de sólidos de 37 a 48 % (p/p). Se concluye que el uso de un modelo matemático que relaciona los parámetros reológicos de la pulpa laterítica y los parámetros energéticos del sistema de bombeo contribuye con la eficiencia energética de la alimentación de la pulpa requerida en el proceso de lixiviación ácida.

Palabras clave: hidromezclas lateríticas; mineral laterítico; modelos matemáticos; parámetros reológicos; temperatura.

Mathematical models of rheological parameters and their influence on the pumping system of non-Newtonian fluids

Abstract

The present paper presents a study of the rheological parameters influence of lateritic hydromixtures with the energetic parameters of the pumping systems, which guarantee productivity when obtaining nickel sulphide. Experimental studies such as X-ray diffraction techniques, X-ray fluorescence and particle size analysis were carried out to model apparent viscosity, initial shear stress, mass consistency index and flow index. The above, based on the following factors: temperature, solids content, chemical and granulometric composition. The results showed that the lateritic suspensions behaved as non-Newtonian fluids with plasticity, due to their character of polydispersed materials, with a predominance of fine granulometry (particles less than 0.045 mm), which explains their rheological behavior, adjustable to the Bulkley - Herschel model at temperature values of 28 to 90 °C and solids concentration of 37 to 48 % (w/w). It is concluded that the use of a mathematical model that relates the rheological parameters of the lateritic pulp and the energy parameters of the pumping system contributes to energy-efficiency of the pulp feeding in the acid leaching process.

Palabras clave: Lateritic hydromixes; lateritic mineral; mathematical models; rheological parameters; temperature.

Modelos matemáticos de parámetros reológicos e sua influência no sistema de bombeamento de fluidos não-newtonianos

Resumo

Na presente investigação, apresenta-se a influência dos parâmetros reológicos das hidromisturas lateríticas com os parâmetros energéticos dos sistemas de bombeamento que garantem a produtividade na obtenção de sulfato de níquel. A partir de estudos experimentais, tais como técnicas de difração de raios X, fluorescência de raios X e análise do tamanho de partícula, o comportamento da viscosidade aparente, o esforço de cisalhamento inicial, o índice de consistência de massa e o índice de fluxo são modelados. Acima, com base nos fatores a seguir: temperatura, teor de sólidos, composição química e granulométrica. Os resultados mostraram que as suspensões lateríticas se comportam como fluxos não-newtonianos com plasticidade, devido ao seu caráter de materiais polidispersos, com predominância de granulometria fina (partículas menores do que 0,045 mm), o que explica seu comportamento reológico, ajustável ao modelo de Bulkley - Herschel a valores de temperatura de 28 a 90 °C e concentração de sólidos de 37 a 48 % (p/p). Conclui-se que o uso de um modelo matemático que relaciona os parâmetros reológicos da polpa laterítica e os parâmetros de energia do sistema de bombeamento contribui para a eficiência energética da polpa de alimentação no processo de lixiviação ácida.

Palavras-chave: hidromisturas lateríticas; mineral laterítico; modelos matemáticos; parâmetros reológicos; temperatura.

Introducción

En la extracción del níquel mediante lixiviación ácida a presión, el transporte de las pulpas (también denominadas hidromezclas) implica un elevado consumo energético, debido a su alta concentración de sólidos y a problemas operacionales. Por tanto, se hace necesario investigar los factores que inciden en la variación de las propiedades de las hidromezclas tanto en el consumo de energía eléctrica como en los parámetros operacionales. Algunos investigadores han dedicado sus estudios al campo de la reología de polímeros [1], [2] y de emulsiones de petróleo [3], [4], [5]. Otros han analizado el comportamiento reológico de suspensiones de minerales tales como bentonita [6], [7] goethita [8] y lateritas procedentes de distintos yacimientos [8], [9], [10].

Las tendencias más recientes en la reología son los sistemas multifases, la formulación del producto, la interfaz, microreología y microfluidos, así como sus aplicaciones en alimentos, polímeros, biopolímeros y cosméticos. Así lo confirman las sociedades y grupos de reología de España, Portugal, E.U, Canadá, Japón y Gran Bretaña [11]. De igual modo, la sociedad de reología de México confirma estudios de minerales biolixiviados en etapa experimental en la Universidad Nacional Autónoma de México [12].

Ahora bien, la pulpa laterítica (materia prima de la extracción de níquel) se caracteriza de acuerdo con las condiciones de la etapa del proceso. Posee diversas cualidades reológicas determinadas por sus propiedades mineralógicas, químicas, granulométricas y físico-mecánicas (densidad, viscosidad y su condición de plasticidad) que determinan su comportamiento como fluido estructurado. Estas pulpas muestran un comportamiento pseudoplástico y características plásticas, debido fundamentalmente a la concentración de sólidos [13], [14]. Este comportamiento incide negativamente en el transporte, ya que implica un aumento de la potencia de bombeo. Por tanto, la concentración total de sólidos, además de ser el factor de mayor incidencia en el comportamiento reológico no newtoniano, afecta el rendimiento del conjunto motor-bomba, cuya correcta valoración exige el conocimiento del modelo reológico, las características de la red hidráulica, potencia hidráulica (Nh) y potencia eléctrica (Nm) [15].

En estudios previos se reportan caracterizaciones realizadas a las pulpas lateríticas [10], [16] en yacimientos que difieren a los que se encuentran en explotación. De igual modo, esos resultados se obtuvieron en un viscosímetro rotatorio y fueron caracterizados como Bingham y Bulkley-Herschell, según las concentraciones de sólidos. Como estas son condiciones de operación diferentes a las actuales, se hace necesario comprobar si las nuevas caracterizaciones reológicas tienen influencia sobre los parámetros energéticos del sistema de bombeo, pues se utilizan valores que fueron obtenidos al inicio de la explotación o que consideran las hidromezclas lateríticas como fluidos newtonianos.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la influencia, a través de modelos matemáticos, de los siguientes parámetros reológicos: viscosidad aparente, esfuerzo cortante inicial, índice de consistencia e índice de flujo de las hidromezclas en función de la concentración de sólidos, la temperatura, la composición química y granulométrica en el intervalo de variación de estos factores en las condiciones de operación del sistema de bombeo y su influencia en los parámetros energéticos: cargas, pérdidas hidráulicas, potencia y eficiencia.

Materiales y métodos

Para la realización de este trabajo se escogieron dos muestras compósito de pulpa laterítica, cada una de 20 L; se tomaron durante 12 h en días alternos. En la Tabla 1 se relacionan los puntos de muestreo y concentración de sólidos.

También se tomaron muestras de agua de reboso de los tanques de sedimentación para realizar las diluciones necesarias para la preparación de soluciones con diferentes porcentajes de sólidos 37, 40, 43, 46 y 48 % (p/p), los cuales incluyen los valores promedio de la industria, reportados según el control de operaciones.

Tabla 1. Contenido de sólidos de las muestras tomadas.

Muestras	Punto de Muestreo	% Sólidos (p/p)
MC1	Salida Espesador A	44,05
MC2	Línea de transferencia	40,67

Análisis químico y mineralógico

La composición química de las muestras estudiadas fue determinada por el método de fluorescencia de rayos X, en un espectrómetro de fluorescencia de rayos - X PW 1480 (Philips, USA). Para las identificaciones de las fases mineralógicas se empleó difracción de rayos-X (DRX) según método policristalino; se utilizó el difractómetro de Philips, modelo PW 3710 (USA).

El número de mineral (N_{rmin}) se calcula a partir del conocimiento de la composición química de la pulpa laterítica. Según el número de mineral determinado por la ecuación (1), su valor caracteriza el comportamiento de la pulpa en la sedimentación. Se ha comprobado que, cuando $7 < N_{rmin} < 14$, la pulpa tiene la sedimentación deseada [17].

$$N_{rmin} = \frac{\%Mg + \%SiO_2}{\%Co + \%Mn} \quad (1)$$

Porcentaje en la muestra de Sílice (SiO_2), Magnesio (Mg), Cobalto (Co), Manganeso (Mn).

Análisis granulométrico

La determinación de las distribuciones granulométricas de las muestras estudiadas se realizó mediante un analizador de tamaño de partículas del tipo ANALYSETTE 22 (Alemania) COMPACT, el cual permite obtener fracciones de partículas menores de 0,045 mm (325 mallas). Estas partículas no pueden ser determinadas mediante el uso de tamices, pero sí ejercen un efecto importante sobre el comportamiento de estas pulpas.

Existen varios modelos para describir la distribución granulométrica de partículas sólidas en procesos de reducción y de clasificación de tamaño. Entre ellos se encuentran los modelos de Gaudin-Schuhmann, de Rosin-Rammler-Sperling y de Gaudin-Meloy, entre otros. En investigaciones recientes [18], se ha determinado que el método más efectivo para el análisis granulométrico es el de Rosin-Rammler-Sperling. Sin embargo, se ha comprobado que ninguno es capaz de describir la granulometría de las materias primas del proceso de lixiviación ácida, por lo que se utilizó el modelo matemático usado por [17] [19] (2), capaz de describir la distribución granulométrica de estas suspensiones.

$$Y_N = \left(\frac{D_N}{(1-B_N) \cdot D_N + B_N} \right)^S \quad (2)$$

Donde, $D_N = D_p/D_{50}$ y $Y_N = Y_B/Y_{50}$; D_N : diámetro normalizado; Y_N : su correspondiente fracción normalizada; D_{50} : mediana de la distribución acumulativa; $Y_{50} = 0,5$ (50 % p/p) fracción de sólidos correspondiente a la mediana de la distribución; B_N : coeficiente adimensional.

No obstante, en este caso es imposible realizar un ajuste por mínimos cuadrados tradicional, debido a que el modelo no se puede hacer lineal respecto a s y a B_N . Según [20] el método más adecuado es el de Levenberg-Marquardt, sin embargo, es de compleja implementación computacional y necesita de asistencia humana permanente para garantizar su convergencia en cada caso. Esto constituye un obstáculo importante para que el valor de s pueda intervenir en la toma de decisiones en la práctica productiva diaria. Así, se desarrolló una aplicación informática que permite el ajuste del modelo [21]. Su aplicación en este trabajo demuestra que es adecuado para la modelación de la polidispersión de cieno carbonatado y de pulpa laterítica cruda, materias primas del proceso de lixiviación ácida.

Mediciones reológicas

Para las mediciones reológicas se utilizó un viscosímetro rotacional marca HAAKE™ 550 (Thermo Fisher Scientific, USA). Con el viscosímetro se precalentó la pulpa, conectando una bomba de flujo para hacer recircular el agua a diferentes temperaturas. El viscosímetro tiene programadas diez velocidades diferentes y reporta los valores de gradiente de velocidad en $1/s$, el esfuerzo cortante en Pa, la viscosidad en $mPa \cdot s$ y la temperatura en $^{\circ}C$. Su rango de velocidad es 0,5-800 r/min con un error de $\pm 0,1$ %.

Procedimiento para determinar la potencia de bombeo requerida teniendo en cuenta los parámetros reológicos

Se propusieron los siguientes modelos matemáticos (3, 4 y 5) que permiten obtener el punto de operación en correspondencia con los requerimientos del caudal de la bomba centrífuga. Estos modelos se obtuvieron teniendo en cuenta los nomogramas de las bombas centrífugas instaladas, con un coeficiente de correlación igual a 0,95.

$$H = 29,78 + 0,0035Q - 0,000026Q^2 \quad (3)$$

Donde Q: flujo, m^3/s ; H: carga desarrollada por la bomba, m.

$$N_a = 0,00047 + 0,12Q - 7,873 E^{-5}Q^2 \quad (4)$$

Donde Q: flujo, m^3/s ; N_a : potencia de bombeo, kW.

$$\eta = 38,1562 + 0,2062Q - 0,8226H + 0,0014QH - 0,00024Q^2 - 3,9973E^{-5}H^2 \quad (5)$$

Donde Q: flujo, m^3/s ; H: carga desarrollada por la bomba, m; η : eficiencia de la bomba.

Teniendo en cuenta los datos del sistema, se aplicó el Balance de Energía Mecánica (BEM), según las ecuaciones de la metodología plasmada en [22] [23].

Diseño experimental

Las propiedades reológicas o variables dependientes de especial interés para diseñar adecuadamente la operación eficiente del sistema de bombeo son: μ_a : viscosidad aparente de la suspensión ($Y1i, Pa \cdot s$); τ_0 : esfuerzo cortante inicial ($Y2i, Pa$); K: índice de consistencia ($Y3i, Pa \cdot s \cdot n$) y n: índice de flujo ($Y4i$, adimensional).

Para llevar a cabo el estudio del comportamiento reológico de las hidromezclas lateríticas, se tomaron las siguientes variables independientes caracterizadas por los factores que definen sus características reológicas: s : parámetro característico de la granulometría (coeficiente de polidispersión), X_1 ; %S: concentración de sólidos (% p/p de sólidos en la pulpa), X_2 ; T: temperatura, X_3 ; N_{min} : número mineral, X_4 .

Debido a la complejidad para controlar las variables coeficiente de polidispersión y número de mineral, se diseñó un experimento factorial completo 5×7 para las variables o factores concentración de sólidos y temperatura identificada. Para garantizar suficiente representatividad de las variables coeficiente de polidispersión y número de mineral, se seleccionó una muestra compuesta del objeto de estudio, de manera que el número total de muestras experimentales fue 70. Esto garantiza la representatividad de las otras dos variables independientes. Adicionalmente, se hicieron tres repeticiones para cada caso para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

Las variables coeficiente de polidispersión y número de mineral, al igual que las variables dependientes, fueron medidas en las muestras. Los resultados reflejan que sus valores cubren los rangos históricos de las mismas que fueron obtenidos durante el control que realiza la empresa objeto de estudio mediante el sistema de control automatizado implementado.

Resultados y discusión

Composición química y mineralógica de las suspensiones lateríticas

Las principales fases mineralógicas que constituyen las menas lateríticas son: Goethita que contiene del 58 al 78 % del níquel presente en las lateritas [24] [25]. En la maghemita y magnetita se distribuye del 15 al 25 % y en las asbolanas la presencia de níquel está entre 12 y 17 %. El cobalto se distribuye del 80 al 90 % en las asbolanas, del 10 al 20 % en la maghemita y magnetita, y en menor porcentaje en la goethita.

Cabe destacar que, en los reactores del proceso de lixiviación en la tecnología ácida a presión, el níquel y el cobalto presentes en la fracción magnética prácticamente no se lixivian y crean dificultades tecnológicas que ocasionan pérdidas en las colas del proceso. En la Tabla 2 se observa la composición química de las muestras seleccionadas para el experimento.

Como puede apreciarse en la Tabla 2, estas pulpas poseen un alto contenido de hierro, característica típica de las lateritas en las que abundan los óxidos de hierro [26] [27]. En las muestras estudiadas la velocidad de sedimentación estuvo por debajo de 134 $mm/2h$, menor que el promedio. Esto fue debido al alto contenido de sílice, magnesio y aluminio, elementos nocivos para el proceso de extracción de níquel y cobalto [28] [29]. La presencia de estos elementos incrementa el consumo de ácido sulfúrico, es decir, aumenta la relación ácido/mineral (RAM) durante la operación de lixiviación. Esto se traduce en un incremento del costo de producción por este concepto.

Tabla 2. Composición química de las muestras seleccionadas para el experimento.

Elementos	Muestras	
	MC1 (% p/p)	MC2 (% p/p)
Ni	1,21	1,22
Co	0,79	0,20
Fe	42,9	43,3
Mg	1,69	2,6
Al	4,41	4,44
SiO ₂	2,25	6,52
Cr	1,51	1,57
Mn	0,38	0,73
Cu	0,027	0,028
Zn	0,034	0,036
Ni + Co	2,00	1,53
Número de Mineral	3,97	12,19

En las determinaciones mineralógicas se detectó que la suspensión de laterita proveniente de la MC1 no contenía gibbsita. Por el contrario, la suspensión de MC2 alcanzó un 8 % de esta fase, con pequeñas diferencias en las cantidades de los óxidos de hierro, maghemita y magnetita (Figura 1). Se corroboró que en la laterita cubana, la goethita constituye la fase mineralógica principal, acompañada de otras fases secundarias como la gibbsita, la serpentina, la maghemita, la magnetita y otras en menores proporciones.

Análisis granulométrico

Los resultados del análisis de distribución de tamaño de partículas minerales son similares a los reportados por Pérez [10], donde se plantea que la pulpa cruda de laterita posee un 30 % de partículas mayores de 0,045 mm (ver Figura 2).

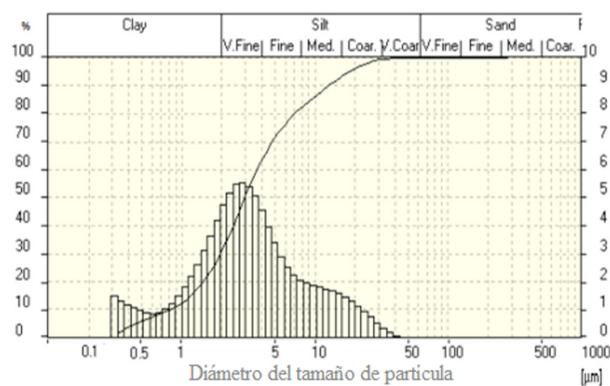


Figura 2. Resultados del análisis granulométrico de la MC1

Como puede observarse, en las pulpas lateríticas existe un predominio de las fracciones finas de forma general: el 80 % de las partículas corresponde con el diámetro de partícula igual a 0,0068 mm. Estas partículas finas determinan la velocidad de sedimentación de este mineral, así como su comportamiento reológico. No obstante, estas hidromezclas tienen un comportamiento propio de sistemas polidispersos. Se comprobó que el modelo de polidispersión describe la distribución granulométrica de todas las muestras con elevados coeficientes de correlación (Tabla 3), a pesar de las pequeñas diferencias existentes entre ellas.

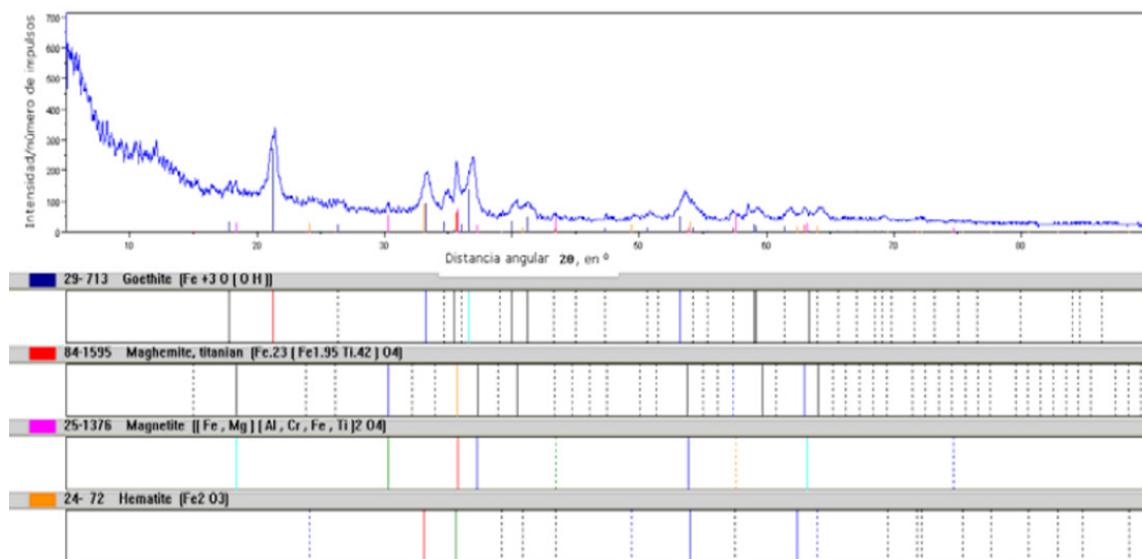


Figura 1. Difractograma de la pulpa laterítica de MC2.

Tabla 3. Parámetros granulométricos que describen el modelo.

Muestras	D ₅₀ μ _m	B _N	s	R
MC1	2,980	0,1738	0,55	0,9918
MC2	2,907	0,4354	0,85	0,9949

Resultados experimentales de la reología en pulpa cruda y precalentada

Al representar gráficamente los datos experimentales de gradiente de velocidad ($\dot{\gamma}$) contra esfuerzo de corte (τ), se trazaron las curvas de flujo a partir del diseño de una aplicación informática. Los resultados fueron ajustados al modelo Bulkley-Herschel para plásticos reales e indicaron la presencia de un esfuerzo de corte inicial (Tabla 4).

Los resultados obtenidos en el análisis de la muestra del espesor se observan en la Figura 3 y la Tabla 5. Allí se evidencia la tendencia de los parámetros reológicos al aumentar las concentraciones de sólidos a temperatura ambiente: se incrementa la viscosidad aparente, el esfuerzo cortante inicial y el índice de consistencia, mientras disminuye el índice de flujo.

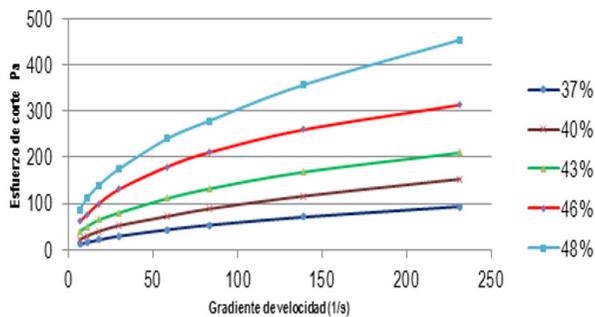


Figura 3. Curvas de flujo a diferentes concentraciones de sólidos a 28 °C, para la MC1

Tabla 4. Valores de esfuerzo cortante por réplicas con viscosímetro HAAKE™ 550.

Variables controladas			Esfuerzo cortante τ					
% S	T (°C)	Gradiente de velocidad	Réplica 1 τ_1	Réplica 2 τ_2	Réplica 3 τ_3	Media τ	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
37	28	231,6	93,37	92,98	93,39	93,25	0,23	0,25
37	28	139	70,38	71,56	68,95	70,30	1,31	1,86
37	28	83,3	52,94	52,69	53,3	52,98	0,31	0,58
37	28	58,43	42,63	43,33	43,02	42,99	0,35	0,82
37	28	29,92	28,41	29,39	29,19	29,00	0,52	1,79
37	28	17,93	21,07	21,21	20,73	21,00	0,25	1,18
37	28	10,7	14,89	15	14,82	14,90	0,09	0,61
37	28	6,45	10,9	11,2	10,9	11,00	0,17	1,57

Este comportamiento es el esperado, demuestra las propiedades plásticas de las hidromezclas lateríticas y la influencia en la potencia de bombeo.

En la Figura 4 se representan las curvas de flujo correspondientes a la muestra MC2 de pulpa. En estos experimentos se varió la temperatura desde 28 a 90 °C, para un valor de concentración de sólidos fijo (43 % p/p).

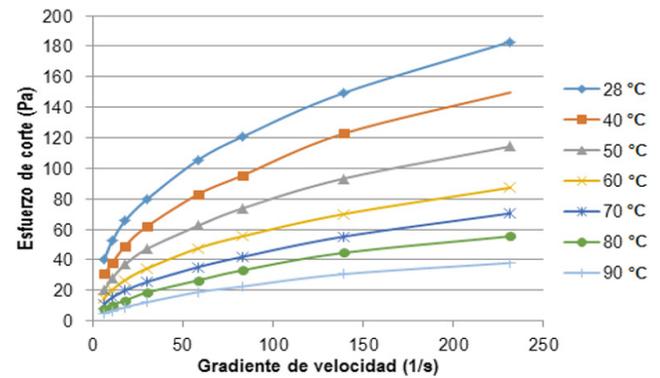


Figura 4. Curvas de flujo de la muestra MC2: pulpa con 43 % p/p de sólidos precalentada a distintas temperaturas.

Las curvas de flujos para 37, 40, 46 y 48 % p/p de sólidos a diferentes temperaturas presentan un comportamiento similar. Para estas condiciones los resultados experimentales responden al Modelo de Bulkley-Herschell pseudoplástico, donde los coeficientes de regresión de los modelos mínimos cuadrados son mayores que 0,99. Se deduce que los valores de viscosidad aparente, el esfuerzo cortante inicial y el índice de consistencia disminuyen cuando aumenta la temperatura, mientras que los valores de índice de flujo aumentan. Este es el comportamiento típico esperado en la mayoría de los líquidos y suspensiones.

Se confirma entonces que, a altas temperaturas, las propiedades plásticas de las pulpas lateríticas disminuyen porque presentan un comportamiento con tendencia a materiales seudoplásticos caracterizados por partículas finas. De ahí que los problemas de alta viscosidad que en ocasiones se presentan con las pulpas lateríticas ocurran a temperatura ambiente.

Tabla 2. Composición química de las muestras seleccionadas para el experimento.

Concentración de sólidos (% p/p)	Viscosidad aparente (Pa·s)	Modelo ajustado	R
37	0,402	$\tau = 5,08 + 1,70 \left(-\frac{dVx}{dy} \right)^{0,74}$	0,9997
40	0,660	$\tau = 22,99 + 5,33 \left(-\frac{dVx}{dy} \right)^{0,67}$	0,9998
43	0,907	$\tau = 22,99 + 5,33 \left(-\frac{dVx}{dy} \right)^{0,67}$	0,9999
46	1,299	$\tau = 38 + 7,94 \left(-\frac{dVx}{dy} \right)^{0,66}$	0,9999
48	1,965	$\tau = 49,74 + 12,67 \left(-\frac{dVx}{dy} \right)^{0,65}$	0,9999

Modelamiento matemático de las propiedades reológicas de las pulpas estudiadas

En las determinaciones mineralógicas se detectó que la suspensión de laterita proveniente de la MC1 no contenía gibbsita. Por el contrario, la suspensión de MC2 alcanzó un 8 % de esta fase, con pequeñas diferencias en las cantidades de los óxidos de hierro, maghemita y magnetita (Figura 1). Se corroboró que en la laterita cubana, la goethita constituye la fase mineralógica principal, acompañada de otras fases secundarias como la gibbsita, la serpentina, la maghemita, la magnetita y otras en menores proporciones.

Debido a que es necesario obtener expresiones concretas que permitan explicar el comportamiento de los parámetros reológicos en función de sus factores coeficiente de polidispersión, concentración de sólidos, temperatura y número mineral, con los resultados de los experimentos realizados se confeccionó una base de datos que permitió evaluar su comportamiento.

Se propone la modelación matemática de mínimos cuadrados mediante el software TIERRA Versión 2.0 que cumple con este propósito [30]. Sean los n datos (Pi;Yi) donde $p=(X1, X2, \dots, XV)$ variables independientes, se quiere encontrar un modelo descrito por una ecuación $Yt=f(P)$ y, en particular, hallar una función f tal que, para cualquier índice i, los valores de f(Pi) sean cercanos a los valores Yi, variables dependientes [31].

A continuación se relacionan modelos matemáticos de mínimos cuadrados obtenidos:

$$\mu_a = -1,8231510 - 0,0245581 s + 0,0757792 \%S - 0,0124297 T + 0,0077888 N_{\min} \quad (6)$$

$$\tau_0 = -7,5155524 - 12,5114987 s + 2,0090722 \%S - 0,4978136 T + 5,5938357 N_{\min} \quad (7)$$

$$K = -7,7626341 - 0,5617544 s + 0,4372325 \%S - 0,1077145 T + 0,3126353 N_{\min} \quad (8)$$

$$n = 0,4832387 + 0,0416324 s + 0,0007904 \%S + 0,0022183 T - 0,0262450 N_{\min} \quad (9)$$

Tiene especial interés comprobar la sensibilidad de todo el procedimiento. Para ello se demostró a partir de datos medidos en la etapa experimental que, con pequeños cambios en los datos de entrada, se producen cambios de igual escala en los pronósticos hechos por los modelos de los parámetros reológicos propuestos (ver Tabla 6).

Tabla 6. Evaluación de la eficacia de los modelos.

Variables	Viscosidad aparente (Pa·s)	Esfuerzo cortante inicial (Pa)	Índice de consistencia (Pa·s ⁿ)	Índice de flujo
Modelo	0,964594	59,38624	10,79257	0,527516
Cálculo	0,985233	59,48153	10,5073	0,522997
Error %	2,09	0,16	2,71	0,86

Los modelos de mínimos cuadrados presentan inconsistencias predictivas cuando los valores de las variables independientes se alejan suficientemente de los rangos de los datos [32]. Estos modelos son válidos para pulpas lateríticas con concentraciones de sólidos de 37 a 48% p/p, temperatura de 28 a 90 °C, número de mineral entre 3 y 16 y coeficiente de polidispersión entre 0,5 y 0,9.

Determinación de la potencia de bombeo requerida teniendo en cuenta los parámetros reológicos

Tomando como referencia los resultados de los modelos matemáticos de los parámetros reológicos y los modelos de los parámetros energéticos de la bomba, se determinó el punto de operación de las bombas centrífugas para diferentes concentraciones de sólidos en las condiciones actuales de operación (el flujo de extracción diseñado del tanque TK1 es de 454 m³/h). Los datos del sistema de bombeo de la pulpa cruda se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Datos de red hidráulica.

Datos	Valor
Diámetro (m)	0,457
Longitud de tubería (m)	430,0
Pérdidas totales	10,84
Flujo volumétrico (m ³ /s)	0,126
Área (m ²)	0,1639
ΔH (m)	9,50

Teniendo en cuenta los datos presentados en la Tabla 7, se aplicó el Balance de Energía Mecánica (BEM) (ver Tabla 8), según las ecuaciones de la metodología plasmada en [22] [23]. Para analizar la influencia de los parámetros reológicos se propuso descomponer el Bingham pseudoplástico en dos: un Bingham plástico, con $n=1$ en los modelos Bulkley-Herschel obtenidos (Tabla 8) y un Seudoplástico, con $\tau_0 = 0$ en la misma ecuación (Tabla 9). Los resultados indican que si no se consideran las pulpas lateríticas como Bulkley-Herschel y con un esfuerzo cortante inicial necesario para que el fluido entre en movimiento (como se muestra en la Tabla 8), se seleccionan incorrectamente las bombas para el trasiego de este tipo de fluido.

En la Tabla 10 se puede apreciar que, a medida que aumenta la temperatura, se requiere menor potencia de bombeo y esto se debe precisamente a la influencia de la temperatura sobre los parámetros reológicos de la pulpa: los valores de viscosidad aparente y esfuerzo cortante inicial disminuyen. Entonces se comprueba que, conforme aumenta la temperatura, el índice de flujo de la hidromezcla laterítica aumenta, sin llegar a ser un fluido newtoniano.

1^{er} Modelo: Bingham Plástico**Tabla 8.** Resultados del BEM con $n=1$.

Concentración de sólidos (% p/p)	Número de Reynolds	Número de Hedstrom	Factor fricción de Darcy	Altura requerida red (m)	Altura de carga bomba (m)	Potencia de la bomba (kW)
37	4691,04	952028,8	0,52	14,72	24,70	73,18
40	1311,42	75754,38	0,6	16,99	26,97	83,88
43	585,20	21668,55	0,72	20,39	30,37	99,42
46	573,95	36559,29	1,08	30,59	40,57	140,18
48	303,52	7778,59	1,4	39,65	49,63	178,10

2^{do} Modelo: Seudoplástico**Tabla 9.** Resultados del BEM teniendo en cuenta $\tau_0 = 0$.

Concentración de sólidos (% p/p)	Número de Reynolds Generalizado	Factor de fricción de Fanning	Factor fricción de Darcy	Altura requerida red (m)	Altura de carga bomba (m)	Potencia de la bomba (kW)
37	259,78	0,0615	0,2463	6,97	16,95	43,11
40	145,09	0,1102	0,4410	12,49	22,47	58,87
43	89,89	0,1779	0,7119	20,16	30,14	81,43
46	79,62	0,2009	0,8037	22,76	32,74	91,32
48	75,05	0,2131	0,8526	24,15	34,13	97,27

Tabla 10. Resultados del BEM con $n=1$.

Concentración de sólidos (% p/p)	Temperatura (°C)	Número de Reynolds	Número de Hedstrom	Factor fricción de Darcy	Altura requerida por la red (m)	Altura de carga de la bomba (m)	Potencia de la bomba (kW)
40	28	987,34	21443,64	0,16	4,01	13,45	15,48
	70	2949,07	45157,03	0,06	2,72	10,63	8,69
	80	4281,83	94396,63	0,068	3,08	10,99	8,38
	90	4453,10	83888,46	0,04	1,81	9,72	7,67

Conclusiones

Por medio de modelos matemáticos se determinó la influencia de los parámetros reológicos y los parámetros energéticos sobre las condiciones de operación del sistema de bombeo de una empresa que extrae níquel a partir de mineral laterítico mediante lixiviación ácida a presión. Los parámetros estudiados permiten resolver las ecuaciones que describen el comportamiento de las curvas características carga–descarga de las redes y de las bombas. Lo anterior contribuye a optimizar la operación en el punto de máxima eficiencia y a aumentar, en no menos de 3 %, el transporte de sólidos con un incremento promedio en la producción entre 1000-1500 t de Ni+Co/año y un ahorro de energía eléctrica de 30 MWh/año. La pulpa laterítica cruda y precalentada con contenido de sólidos entre 37 y 48 % p/p y temperatura entre 28 y 90 °C presenta propiedades plásticas que se ajustan a un modelo de Bulkley-Herschel para plásticos reales. A medida que aumenta la concentración de sólidos, se requiere de mayor potencia en las bombas, debido a que las hidromezclas adquieren un carácter de materiales polidispersos. Con un predominio de granulometría fina, como fue el caso estudiado, las bombas necesitan 50% más de potencia de bombeo ya que las pulpas actúan como un fluido no newtoniano.

Referencias

- [1] M. Gomes and T. Marchese, "Ajuste de modelos reológicos mecánicos no creep de polipropileno, poliestireno e policarbonato: comparação com o mef" *Iberoamericana de polímeros*, vol. 14, no. 2, pp. 65-82, 2013.
- [2] Z. Li, J. Wang, R. Pérez-Camargo, A. J. Müller, B. Zhang, S. M. Grayson and W. Hu, "Non-monotonic molecular weight dependence of crystallization rates of linear and cyclic poly(epsilon-caprolactone)s in a wide temperature range" *Polymer International*, vol. 65, no. 9, pp. 1074-1079, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/pi.5157>.
- [3] M. Briceño, J. L. Salager and J. Bertrand, "Influence of the Dispersed Phase Viscosity on the Mixing of Concentrated Oil-In-Water Emulsions in the Transition Flow Regime" in *International Symposium on Mixing in Industrial Processes – ISMIP4*, Toulouse, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1205/02638760152721794>.
- [4] J. Pal and J. Masliyah, "Rheology of oil in water emulsions with added solids" *Can. J. Chem. Eng.*, vol. 68, no. 1, pp. 24-28, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1002/cjce.5450680103>.
- [5] O. Vernáez, A. García, F. Castillo, M. L. Ventresca and A. J. Müller, "Oil-based self-degradable gels as diverting agents for oil well operations" *J. Pet. Sci. Eng.*, vol. 146, pp. 874-882, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2016.07.029>.
- [6] K. Bekkoura, M. Leyamab, A. Benchabane and O. Scrivener, "Time-dependent rheological behavior of bentonite suspensions: An experimental study" *J. Rheol.*, vol. 49, no. 6, p. 1329, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1122/1.2079267>.
- [7] S. İşiçi, F. S. Güner, O. I. Ece and N. Güngör, "Investigation of rheological and colloidal properties of bentonitic clay dispersion in the presence of a cationic surfactant" *Prog. Org. Coat.*, vol. 54, no. 1, pp. 28-33, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2005.03.002>.
- [8] B. C. Blakey and D. F. James, "Characterizing the rheology of laterite slurries" *Int. J. Miner. Process.*, vol. 70, no. 1-4, pp. 23-39, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0301-7516\(02\)00147-3](https://doi.org/10.1016/S0301-7516(02)00147-3).
- [9] I. Bhattacharya, D. Panda and P. Bandopadhyay, "Rheological behaviour of nickel laterite suspensions" *Int. J. Miner. Process.*, vol. 53, no. 4, pp. 251-263, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0301-7516\(98\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S0301-7516(98)00003-9).
- [10] L. Pérez-García, L. Garcell-Puyáns, A. L. Rojas-Purón and R. Simões-Angélica, "Mineralogía y reología de suspensiones minerales del proceso de lixiviación ácida a presión en Moa, Cuba" *Minería & Geología*, vol. 26, no. 4, pp. 16-35, 2010.
- [11] Universidade de Coimbra, "Challenges in rheology and product development Portugal" in *IBEREO '15*, Coimbra, Portugal, 2015.
- [12] Grupo Español de Reología, "5th Iberian Meeting on Rheology, IBEREO 2015" *BOLETÍN TRIMESTRAL INFORMATIVO*, Vols. octubre-diciembre, no. 0015, pp. 1-3, 2015.
- [13] L. Garcell-Puyáns, "Comportamiento reológico de las pulpas lateríticas" *Minería & Geología*, vol. 8, no. 1-3, pp. 19-23, 1991.
- [14] A. Cerpa, P. Tartaj, M. T. García-González, C. J. Serna and A. García, "Estudio comparativo del comportamiento reológico de muestras lateríticas de diferentes yacimientos que procesa la Empresa Moa Niquel S.A." *RLMM*, vol. 23, no. 1, pp. 3-8, 2002.
- [15] G. Hernández and L. Rojas, "Eficiencia energética en accionamientos para el hidro-transporte de colas lateríticas" in *VII Conferencia Internacional de Aprovechamiento de los Recursos Minerales (CINAREM)*, Moa, Cuba, 2013.
- [16] A. Cerpa, M. T. García-González, C. J. Serna and P. Tartaj, "Relationship between the colloidal and rheological properties of mineral suspensions" *Can. J. Chem. Eng.*, vol. 79, no. 4, pp. 608-611, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/cjce.5450790420>.
- [17] G. H. Pérez, *Modelo matemático que correlaciona los principales factores de influencia sobre el comportamiento reológico de las pulpas lateríticas*, Santiago de Cuba: Tesis Doctorado, Universidad de Oriente, 2010.
- [18] B. Álvarez Rodríguez, G. González García, A. L. Coello-Velázquez and J. M. Menéndez Aguado, "Product size distribution function influence on interpolation calculations in the Bond ball mill grindability test" *Int. J. Miner. Process.*, vol. 15, no. 10, pp. 16-20, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2016.09.004>.
- [19] L. Pérez García and Y. G. P. L. R. Cardero Llópez, "Modelo matemático para describir la distribución granulométrica de la fase dispersa de las suspensiones de laterita" *Revista Tecnología Química*, vol. XXIX, no. 2, pp. 83-91, 2009.
- [20] Hyams Development, *CurveExpert*, Canada: Hyams Development, 1997.
- [21] G. Hernández-Ramírez, A. A. Legrá-Lobaina, L. Garcell-Puyans and R. Martínez-Rojas, "Evaluación de un modelo de polidispersión para la caracterización granulométrica de la pulpa laterítica y el cieno carbonatado" *Minería & Geología*, vol. 32, no. 3, pp. 47-59, 2016.
- [22] H. Gardea Villegas, *Bombeo de fluidos no newtonianos. caso de los lodos residuales*, México: Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
- [23] L. Garcell Puyáns, *Flujo por tuberías de suspensiones minerales no newtonianas*, Santiago de Cuba: Universidad de Oriente, 2001.
- [24] W. Luo, F. Q., L. Ou, G. Zhang and Y. Lu, "Fast dissolution of nickel from a lizardite-rich saprolitic laterite by sulphuric acid at atmospheric pressure" *Hydrometallurgy*, Vols. 1-2, no. 171-175, p. 96, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.08.001>.

[25] A. Hernández Flores, A. A. Legrá Lobaina, R. A. Trujillo Codorniu and M. M. Toirac Suárez, "Beneficio de la mena laterítica: actualidad y perspectivas" *Minería & Geología*, vol. 26, no. 1, pp. 76-95, 2010.

[26] G. Agyei, *Distribución fraccional de las especies metálicas y mineralógicas de la mena niquelífera de un perfil del yacimiento Punta Gorda, Moa, Moa, Cuba*: Tesis de Doctorado, Instituto Superior Minero Metalúrgico "Dr. Antonio Núñez Jiménez", 2006.

[27] J. A. Proenza, "Mineralogía y geoquímica de Ni, Co, EGP, Sc, REE en yacimientos lateríticos" *Macla*, n° 20, pp. 3-9, 2015.

[28] S. Y. Martínez, *Caracterización de la relación entre las litologías del basamento, la mineralización resultante y los parámetros industriales en yacimientos de la empresa "Pedro Sotó Alba"*, Moa, Cuba: Tesis de Maestría, Instituto Superior Minero Metalúrgico de Moa 'Dr Antonio Núñez Jiménez', 2016.

[29] J. N. Muñoz-Gómez, A. Rodríguez-Infante and I. Barea-Pérez, "Variabilidad de los perfiles lateríticos en los yacimientos ferroniquelíferos de Moa" *Minería & Geología*, vol. 31, no. 2, pp. 21-33, 2015.

[30] A. A. Legrá-Lobaina, *Software Tierra. Versión 2.2*, Moa, Cuba: Instituto Superior Minero Metalúrgico de Moa, 2014.

[31] A. A. Legrá Lobaina, "La investigación científica. Conceptos y reflexiones" *Congreso Universidad*, vol. 1, no. 3, 2012.

[32] G. Hernández-Ramírez, A. A. Legrá-Lobaina and B. Ramírez-Serrano, "Modelos matemáticos para pronosticar parámetros reológicos de hidromezclas lateríticas" *Minería & Geología*, vol. 33, no. 4, pp. 384-400, 2017.

Article citation:

G. Hernández-Ramírez, A. A. Legrá-Lobaina, L. Rojas-Hidalgo, B. Ramírez-Serrano & A. Mariño-Pérez, "Modelos matemáticos de parámetros reológicos y su influencia en el sistema de bombeo de fluidos no newtonianos" *Rev. Colomb. Quím.*, vol. 47, no. 3, pp. 52-60, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v47n3.70248>.